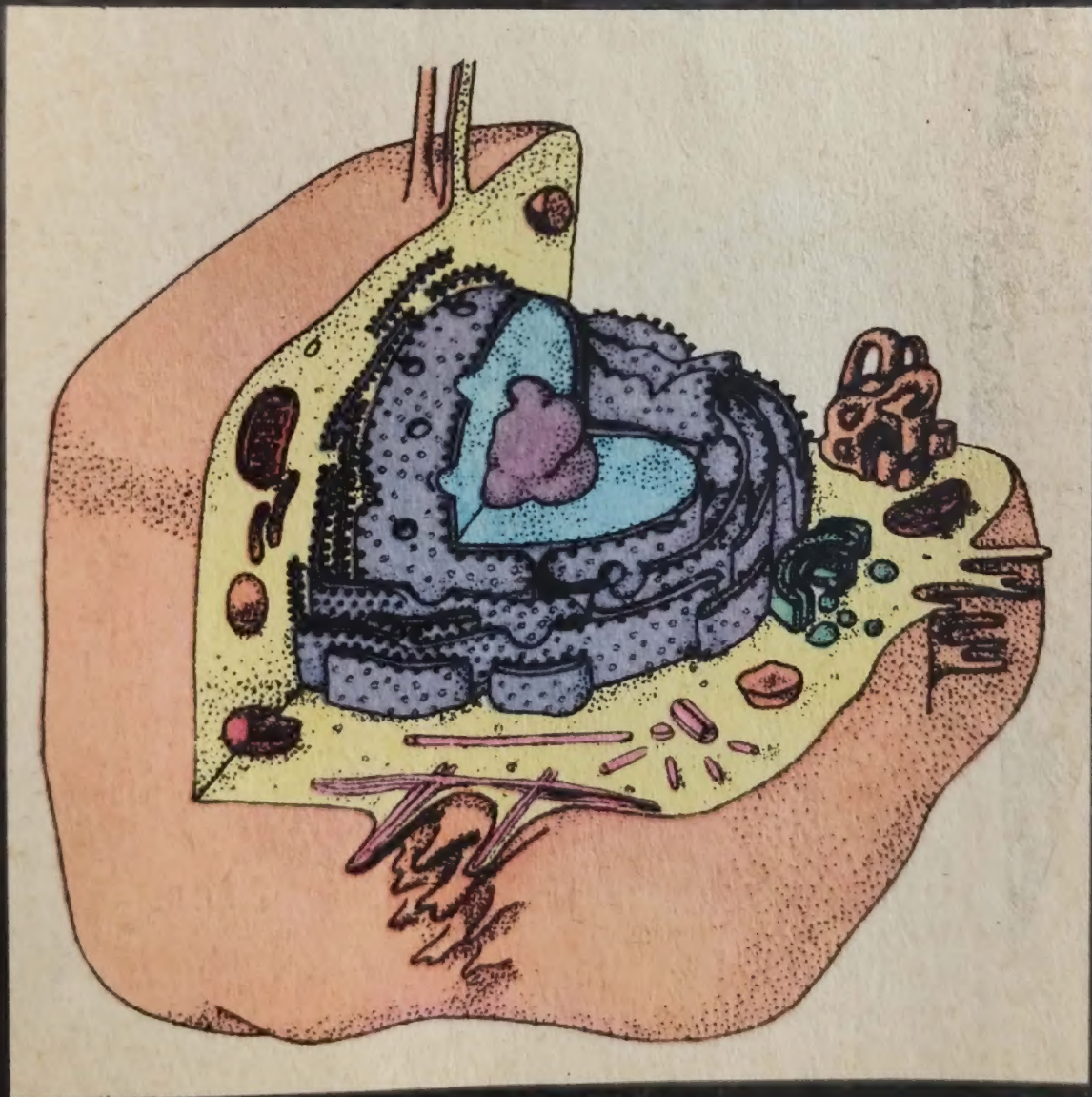


CONSTANTIN COTRUTZ
CARMEN COTRUTZ-MARIA KOCSIS
CEZAR RADU IONESCU

MANUAL DE LUCRĂRI PRACTICE DE BIOLOGIE CELULARĂ



EDITURA "TEHNICA"
1994

Constantin Lape

AN III BIOINGINERIE

AN I MEDICINĂ GENERALĂ

Prof. Univ. Dr CONSTANTIN COTRUTZ

Dr. CARMEN COTRUTZ Chim. MARIA KOCSIS Fiz. C.R.IONESCU

*Departamentul de Biologie Celulară și moleculară
Universitatea de Medicină și Farmacie Gr.T.Popa - Iași*

MANUAL

de

LUCRĂRI PRACTICE DE BIOLOGIE CELULARĂ

Editura • TEHNICA •

CHIȘINĂU

1994



REFERENT ȘTIINȚIFIC
prof.univ.dr.D.D.BRĂNIȘTEANU
Departamentul de fiziologie
U.M.F. "Gr.T.Popa" - Iași

Format 70 x 100 1/16
Tiraj 10000 ex.
Coli de tipar : 15,5
Editura "TEHNICA"
Chișinău, str. Studențimii, 9
Comanda nr. 422
Firma editorial - poligrafică "Tipografia centrală"
277068, Chișinău, Florilor, 1.

Manual de lucrări practice de biologie celulară.
În 1 volum/C-tin Cotrutz, C.Cotrutz, M. Kocsis, C.R.Ionescu - ed.Tehnica 1994 -
244 p.

ISBN 5-85268-314-0

Lucrarea de față, ediție revizuită și îmbunătățită a îndrumătorului de lucrări practice de biologie celulară litografiat în 1989, se adresează studenților de la facultățile de Medicină, Stomatologie și de la alte facultăți cu profil biologic, în dorința de a-l iniția în metodologia complexă de studiu a celulei.

c C-tin Cotrutz, 1994

MOTTO

"Mintea e ciutura care stă deasupra fântânii vieții și coboară numai pentru a se umple cu răcoarea învățării."

(Vasile Voiculescu - *Așchii de meditație*)

"Vom trăi o perioadă extraordinară în materie de dezvoltare a științelor biologice. Pe măsură ce vom aplica tehnici de biologie celulară și moleculară în cercetarea medicală, mare parte a enigmelor patologiei umane vor fi rezolvate în următorii ani. Sunt convins că științele medicale vor cunoaște de acum înainte faza cea mai productivă și cea mai pasionantă din istoria lor. Ferice tinerilor practicieni care vor fi actorii."

Sir David Weatherall - The New Genetics and Clinical Practice - Oxford University Press - 1985

INTRODUCERE

Disciplină relativ nouă și în continuu progres, rezultatul unei îndelungate evoluții înregistrate în studiul celulei atât sub aspect morfologic, funcțional și molecular, biologia celulară și moleculară urmărește să formeze studenților în medicină și biologie conceptele generale asupra biologiei celulare normale dar și patologice cât și de a-i introduce în diversitatea structuralizării corpurilor vii.

Dezvoltarea biologiei celulare și moleculare contemporane se realizează în două direcții care au condus și la nașterea acestei ramuri a științelor biologice: perfecționarea tehnicilor de investigare a celulei pe de o parte, și progresele conceptuale pe de altă parte.

Dintre principalele tehnici de investigare a celulei le amintim pe cele folosite cu succes în ultimii ani: microscopia fonică revitalizată, microscopia electronică cu perfecționări ale tuturor variantelor sale, fracționarea celulară prin ultracentrifugare diferențiată, tehnici biofizice, biochimice, ca și o serie de tehnici de biologie celulară și moleculară dezvoltate în special în ultimii ani, au condus la elaborarea de tehnologii complexe bazate pe culturi de celule, fuziuni celulare, etc.

Această succintă trecere în revistă a principalelor metode de investigare a celulelor și a progreselor acestora, departe de a fi completă, ilustrează totuși dinamismul acestei ramuri a biologiei contemporane iar integrarea informațiilor primite prin toate metodele și la toate nivelele constituie o altă caracteristică a dezvoltării disciplinei de biologie celulară și moleculară contemporane.

Lucrarea de față, ediție revizuită și îmbunătățită a îndrumătorului de lucrări practice de biologie celulară litografiat în 1989, se adresează studenților de la facultățile de Medicină, Stomatologie și de la alte facultăți cu profil biologic, în



dorința de a-i iniția în metodologia complexă de studiu a celulei.

Materialul prezentului manual de lucrări practice este structurat în două părți: partea I-a - consacrată principalelor tehnici utilizate în biologia celulară, trecând în revistă doar o parte a acestora, cele aflate la îndemâna departamentului nostru și partea a II-a - conținând studiul general al celulei, menită a evidenția mai clar atât tehnologia cât și obiectul biologiei celulare.

Dezvoltarea viitoare a biologiei celulare și moleculare este nelimitată și putem afirma cu toată convingerea că azi cunoaștem doar vârful unui iceberg a cărui parte pe care nu o vedem este infinită și din care vom explora cu siguranță din ce în ce mai mult, în scopul îmbunătățirii stării de sănătate, a vieții omului, a condiției umane pe Terra.

Mulțumim D-nei ing. Minodora Bălțătescu de la disciplina noastră care, prin munca și talentul său, a reușit să execute grafica acestui manual și tuturor acelor cititori care comunicându-ne sugestiile lor vor contribui la o mai mare claritate și dezvoltare a unor capitole din această primă ediție.

AUTORII

I. MIJLOACE TEHNICE DE STUDIU ÎN BILOGIA CELULARĂ

Studiul celulei a progresat în ultima perioadă și datorită perfecționării metodelor de investigare, permițând acumularea de noi observații. Astfel, microscopia electronică de transmisie cu voltaj înalt a îngăduit observarea pentru prima dată a celulelor vii. Utilizarea difracției cu raze X a produs o revoluție în științele biologice prin descifrarea structurii spațiale a proteinelor și acizilor nucleici; combinată cu microscopia electronică a permis obținerea structurii tridimensionale a unor ansambluri ca de exemplu bacteriorodopsina. Metoda difracție-dispersie a permis descifrarea organizării moleculare a cromatinei. Rezonanța magnetică nucleară de înaltă rezoluție a fost utilizată în elucidarea interacțiunilor moleculare în membranele biologice și în studii metabolice pe celule intacte. Tehnicile de spectrofluorometrie s-au perfecționat în ultimul timp permițând aprecierea prin probe de fluorescență a vâscozității membranelor, a difuziei sau rotației proteinelor membranare iar tehnicile biochimice de biologie moleculară au ajuns de neînlocuit, atât ca o completare a metodelor amintite cât și în mod independent. În ultimii ani s-au elaborat tehnologii de biologie celulară și moleculară complexe bazate pe culturi celulare, fuziuni celulare, purificări de gene (tehnologia ADN-ului recombinat), etc.

Putem afirma deci că biologia celulară și moleculară folosește metode de studii morfologice, biochimice, funcționale, biofizice, etc. În vederea înțelegerii organizării ansamblurilor de molecule în structuri, a proceselor legate de biosinteza acestora precum și funcțiile asociate lor, a proceselor patologice, deci pentru investigarea în domeniul ultrastructural, este necesară coborârea treptată, cu ajutorul mijloacelor moderne de investigare de la celulă la atom, așa cum este prezentată în fig.1.

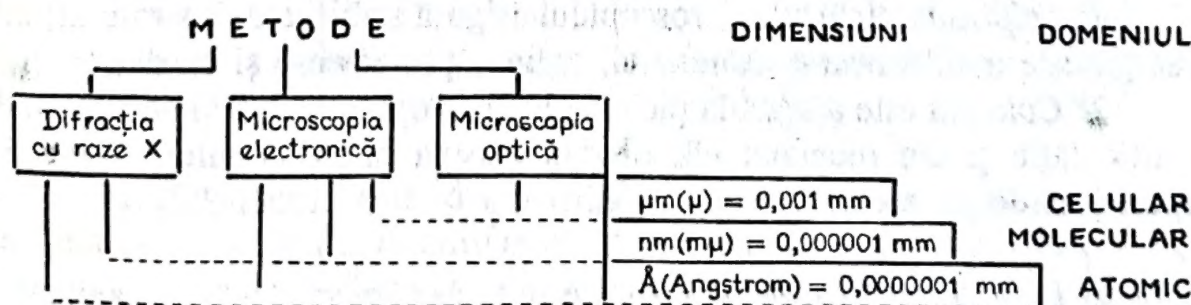


Fig.1.

Dintre mijloacele tehnice morfologice, o primă etapă în studiul celulei este reprezentată de microscopia fotonică.

1.1. MICROSCOPUL FOTONIC

Microscopul fonic este un aparat optic de mărit care utilizează ca sursă de radiație fotonul, element din spectrul undelor electromagnetice.

Examenul citologic în microscopia fonică este limitat de puterea de separare sau rezoluție a aparatului, calitatea cea mai de preț a unui microscop. Puterea de rezoluție reprezintă cea mai mică distanță la care două puncte pot fi văzute distinct și se calculează după formula lui Abbe. Se consideră ca limită maximă pentru puterea de rezoluție a microscopului fonic este de 0,2 microni, valoare care nu va putea fi depășită din cauza lungimii de undă mari a fotonului.

Prin montarea unor dispozitive speciale la microscopul fonic obișnuit, se poate realiza:

- microscopia în contrast de fază,
- microscopia în lumină fluorescentă,
- microscopia pe fond întunecat,
- microscopia în lumina polarizată.

1.1.1. Microscopul fonic obișnuit

Microscopul fonic obișnuit se compune din trei părți: mecanică, optică și sursa de lumină.

1.1.1.1. Partea mecanică sau stativul microscopului este construit din metal și reprezintă suportul pentru partea optică și sursa de lumină. Se compune din:

1. Talpa sau piciorul microscopului asigură stabilitatea aparatului; în ea se găsește montată sursa de lumină, oglinda proiectoare și un diafragm.

2. Coloana este atașată la piciorul microscopului printr-un dispozitiv de articulație și are montate: platina sau măsuta microscopului, tubul și dispozitivul de punere la punct a imaginii.

a. Platina este dispozitivul pe care se fixează preparatul de examinat. Are o formă rotundă sau pătrată și este dispusă perpendicular pe axa optică a microscopului; în centru are o deschidere rotundă sau dreptunghiulară prin care trec razele de lumină spre preparatul de examinat. Cu ajutorul a două

vize laterale, platina se poate deplasa în plan orizontal în vederea examinării preparatului pe toată suprafața sa. Pe fața ei superioară se găsesc două dispozitive de fixare a portobiectului (valeți) și o riglă gradată destinată reperării unor teritorii de pe suprafața preparatului (fig.2).

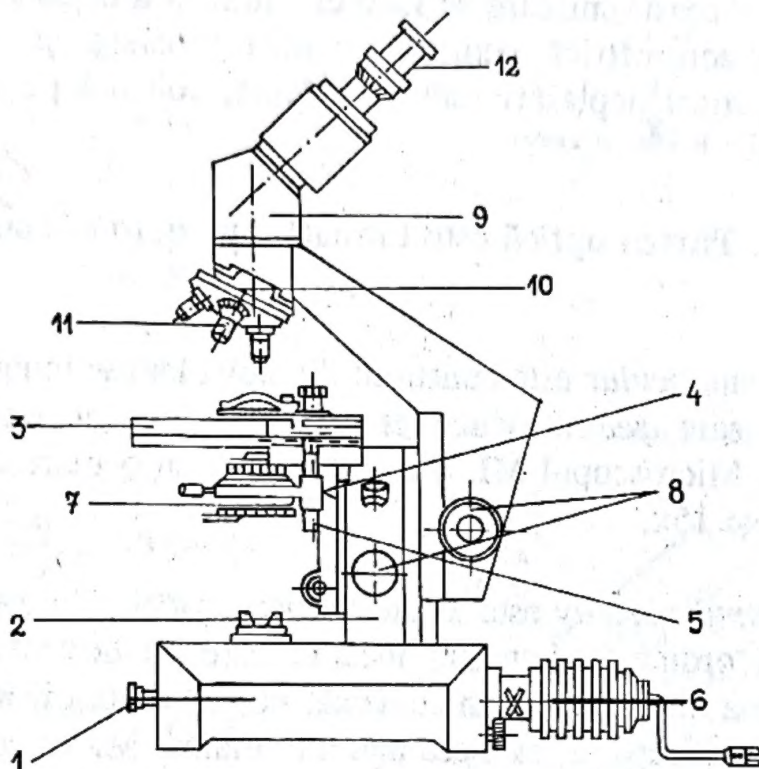


Fig.2. 1-Talpa microscopului; 2-Coloana; 3-Platina; 4-Dispozitivul de mișcare a platinei; 5-idem; 6-Sursa de lumină; 7-Condensatorul; 8-Macro și microviza; 9-Tubul microscopului; 10-Revolverul; 11-Obiective; 12-Ocularul

b. Tubul are montat la extremități sistemul obiectiv-ocular (în partea inferioară sistemul obiectiv iar în partea superioară sistemul ocular). Cu ajutorul a două șuruburi numite vize, tubul se deplasează în sus sau în jos, mișcări necesare pentru obținerea unei imagini clare.

c. Revolverul este dispozitivul pe care se montează elementele sistemului obiectiv (la microscopul ML4 sunt montate cinci obiective de puteri măritoare crescânde care pot fi aduse în axa optică a microscopului). Este format din două discuri: unul mobil pe care se fixează cele cinci obiective cu puteri măritoare crescânde și altul fix care se atașează la extremitatea inferioară a tubului; acesta din urmă este prevăzut cu un

dispozitiv de stopare care blochează fiecare obiectiv în parte când axa acestuia coincide cu axa optica a microscopului.

d. Dispozitivul de punere la punct este necesar pentru obținerea de imagini clare și se realizează prin deplasarea sistemului obiectiv - ocular în sus sau în jos. Această mișcare se face cu ajutorul a doua șuruburi numite vize: - viza macrometrică pentru deplasări grosiere și rapide și viza micrometrică pentru deplasări reduse și lente, folosită pentru punerea la punct a imaginii.

1.1.1.2. **Partea optică** este formată din **sistemul ocular** și **sistemul obiectiv**.

1. **Sistemul ocular** este constituit din două lentile montate într-un tub metalic scurt care se introduce la extremitatea superioară a tubului microscopului. Microscopul ML 4 este prevăzut cu oculare care măresc de 5x., 7x., 10x. și 15x.

2. **Sistemul obiectiv** este alcătuit dintr-o asociație de lentile montate într-o anumită ordine într-un tub metalic care se înșurubează pe capul revolver. Lentila inferioară, plan convexă, numită **lentila frontală**, orientată cu fața plană spre preparat, este cea mai importantă. Microscopul ML 4 este dotat cu obiective uscate cu puterea de mărire de 6x., 10x., 20x., 40x. și cu imersie (ulei + de cedru) care are o putere de mărire de 90x (fig.3).

1.1.1.3. **Sursa de fotoni și dispozitivul de transmisie** cuprinde:

1. **Sursa de lumină** este inclusă în talpa microscopului și este reprezentată de un bec de 6V alimentat de un transformator.

2. **Dispozitivul de transmisie** este reprezentat de o **oglină plană** montată în tapla microscopului și are rolul de a orienta razele luminoase în axul optic al microscopului cu ajutorul a două vize. Între sursa de lumină și oglindă se găsește un **diafragm iris**.

3. **Condensorul de lumină** este un sistem de lentile montate într-un dispozitiv mobil aflat sub platină și are rolul de a focaliza lumina pe preparatul microscop. Pentru o iluminare eficientă a preparatului este necesară **corectarea aperturii numerice a condensorului cu cea a obiectivului**

și se realizează cu ajutorul unui **diafragm iris**, manipulat cu o pârghie.

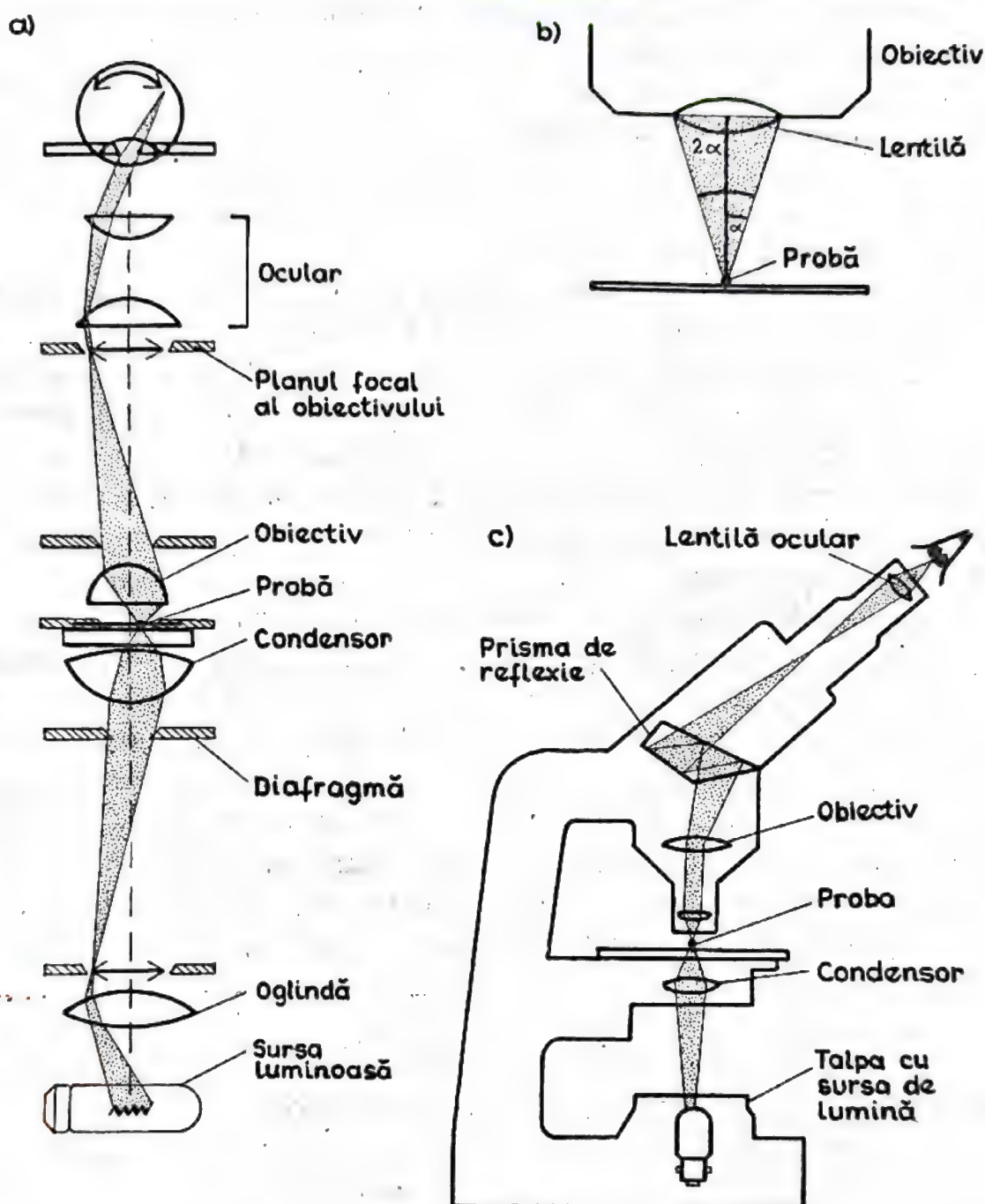


Fig.3. Sursa de lumină, partea optică și formarea imaginii la microscopul fonic

1.1.1.4. Tehnica de lucru

- Se stabilește legătura între becul microscopului și transformator care se conectează apoi la rețeaua de 220 V;
- prin rotirea revolverului se aduce în axul optic al microscopului

obiectivul 10.x;

- privind prin oculare, se coboară condensatorul până când se obține o lumină uniformă și de intensitate mare;

- se așează lama portobiect cu lamela în sus pe fața superioară a platinei, fixând-o cu ajutorul vafeților;

- privind lateral, cu ajutorul vizei macrometrice se coboară tubul până la o distanță mai mică decât distanța focală a obiectivului (pentru obiectivul 10.x distanța focală este de 16 mm);

- se fixează distanța interpupilară a examinerului prin apropierea sau îndepărtarea laterală a celor două tuburi oculare;

- privind prin ocular, se ridică încet tubul cu ajutorul vizei macrometrice până când apare o imagine în câmpul microscopului; dacă nu apare nici o imagine înseamnă că: obiectivul nu se află în axul optic, preparatul nu se află în câmpul microscopului sau am ridicat prea repede sistemul optic. Prin mișcarea vizei micrometrice în ambele sensuri se obține o imagine clară și luminoasă a preparatului.

ATENȚIE - imaginea nu se va căuta prin coborârea tubului deoarece există riscul de a deteriora lentila frontală a obiectivului și lama portobiect;

- în timpul examinării se recomandă să se țină în permanență mâna pe viza micrometrică în vederea menținerii unei imagini clare în timpul deplasării câmpului deoarece preparatul nu are o grosime uniformă;

- cu ajutorul celor două vize montate pe partea laterală a platinei se va mișca lama cu preparatul în vederea examinării lui în totalitate;

- se rotește revolverul aducând pe rând în axul optic al microscopului obiectivele 20.x, 40.x și imersie, ridicând condensatorul pentru a obține o iluminare puternică.

ATENȚIE - în cazul folosirii obiectivelor mari, pentru punerea la punct a imaginii se utilizează numai viza micrometrică.

- utilizarea obiectivului cu imersie necesită ridicarea la maximum a condensatorului iar difragmul iris deschis complet; pe preparatul fixat pe lama (frotiu de sânge colorat) se pune o picătură de ulei de cedru. Cu tubul ridicat se rotește capul revolver și se aduce în axul optic obiectivul de imersie; privind lateral, se coboară tubul cu ajutorul vizei macrometrice până când lentila frontală a obiectivului a făcut contact cu picătura de ulei de cedru și se află în imediata vecinătate a lamei portobiect (aproximativ 2 mm). Privind prin ocular, se prinde imaginea coborând sau ridicând încet tubul microscopului cu ajutorul vizei macrometrice iar punerea la punct a imaginii se obține cu viza micrometrică;

- după examinare, se ridică tubul microscopului cu 1-2 cm., se dă jos lama portobiect de pe platină și se îndepărtează uleiul de cedru de pe lentila frontală a obiectivului prin ștergere cu vată înmuiată în xilol sau benzen;
- după folosire, microscopul se deconectează de la rețea și se pune la adăpost de praf (sub husă).

1.1.2. Microscopia prin fluorescență

Microscopia prin fluorescență pune în evidență fenomene luminoase care iau naștere în structuri biologice primare (naturale) sau a celor secundare provocate cu ajutorul substanțelor numite fluorocromi.

Metoda se bazează pe proprietatea unor substanțe care, iradiate cu un fascicul de lumină cu o lungime de undă mică și cu frecvență înaltă emit radiații cu o lungime de undă mare și o frecvență mai joasă deci, de culoare diferită. Aceste substanțe se numesc **fluorescente**.

Fluorescența este condiționată (Mayer) de prezența unor grupări fluorofore cum ar fi: **azin, oxazin**, etc.

În practica curentă, prin fluorescență se înțelege emiterea de radiații luminoase de către o substanță supusă acțiunii razelor ultraviolete (300 - 400 milimicroni). Se formează o imagine vizibilă, colorată, care poate fi observată cu ochiul protejat de un filtru pentru radiațiile ultraviolete sau care impresionează placa fotografică (fig.4).

Emisia spectrului de fluorescență se prezintă sub formă de benzi (**linii Stokes**) și nu este un spectru continuu, fiind în funcție de mărimea moleculei. Fenomenul poate fi observat în orice stare de agregare a substanței, fiind mai intens la lichide și solide.

Fluorescența unui preparat microscopic poate fi clasificată în două categorii:

1. **Fluorescență primară, naturală sau autofluorescență** produsă de substanțe care se găsesc în mod natural în celule sau țesuturi (**lipofuscina, cromolipidele, fenilalanina, tirozina, adrenalina, noradrelanina**, etc.).

2. **Fluorescență secundară sau provocată** indusă prin tratarea secțiunilor de țesut cu **fluorocromi** (ex: **acridin-orange**); prin această metodă se pot detecta **acizii nucleici, fibrele de collagen, reticulina și elastice, mucinele**, etc.

1.1.2.1. **Microscopia în lumina fluorescentă** folosește un microscop obișnuit cu următoarele particularități:

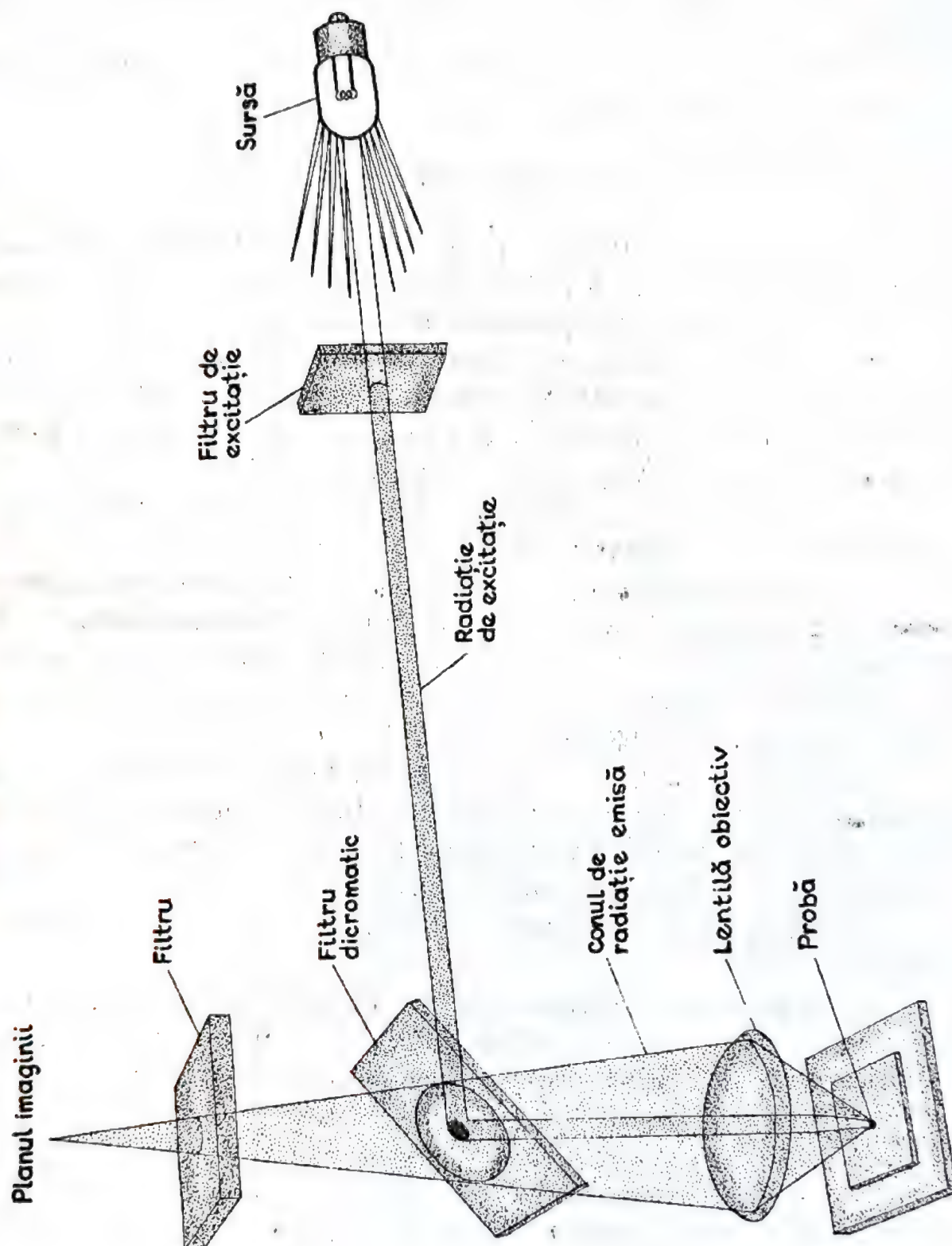


Fig.4. Reprezentarea schematică a microscopului prin fluorescență.

a. sursa de lumină este o lampă cu vapori de mercur (H.B.O. - 200 W, 3,3 - 3,9 A) care emite radiații U.V.;

b. filtre de lumină care opresc radiațiile vizibile și calorice; se folosesc două tipuri de filtre:

- filtre de excitație care au rolul de a opri toate radiațiile în afara celor U.V.; se montează în talpa microscopului, între oglindă și condensor;

- filtre de protecție care protejează retina și se montează între obiectiv și ocular.

c. condensatorii utilizați în microscopia de fluorescență sunt de trei feluri: condensor U.V. cu apertură numerică 1,20, pentru câmp întunecat și cu oglindă, care se montează în locul condensorului obișnuit.

1.1.2.2. Tehnica de lucru

- După montarea dispozitivelor menționate, se pornește lampa H.B.O. și se așează pe platina microscopului preparatul de examinat aplicat pe o lamă portobiect nefluorescentă;

- pentru găsirea câmpului și punerea la punct a imaginii se procedează la fel ca în capitolul 1.1.1.4.;

- după examinare se întrerupe alimentarea de la rețea a lămpii H.B.O.

ATENȚIE - este interzis a se privi radiațiile produse de lampa H.B.O. fără ochelari de protecție U.V.; este interzisă manipularea carcasei în timpul funcționării lămpii sau imediat după stingerea ei înainte de răcire întrucât există pericol de implozie.

1.1.2.3. Aplicații practice

Microscopia în lumina fluorescentă reprezintă o metodă cu o largă aplicabilitate în biologia celulară.

1. Cu ajutorul *fluorescenței primare* pot fi identificați:

a. pigmenții: porfirinele (fluorescența roșie), lipocromii sau pigmenții carotenoizi (fluorescența verde), cromolipidele (fluorescența galben-verde), lipofuscina (fluorescența roșu-brun);

b. acizii aminați: fenilalanina, tirozina, triptofanul (fluorescenta albastră);

c. unele virusuri și bacilul Koch emit o fluorescență verde strălucitor;

d. dintele natural este autofluorescent, proprietate prin care se deosebește de cel artificial;

e. aminele biogene: adrenalina, noradrenalina, serotonina (fluorescență verde).

2. Cu ajutorul fluorocromării cu acridin orange se pot identifica:

a. acizii nucleici ARN-ul - fluorescență roșie, A.D.N-ul - fluorescență verde - galben;

b. fibrele de colagen, elastice și de reticulină - fluorescență verde;

c. nucleii leucocitelor au o fluorescență verde iar citoplasma lor și eritrocitele rămân opace;

d. mucinele - fluorescență verde.

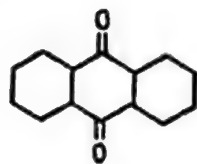
Colorația cu acridin orange se mai utilizează în citodiagnosticul precoce al cancerului (studiul acizilor nucleici în condițiile unui proces tumoral).

Cea mai importantă aplicație este imunofluorescența care se bazează pe cuplarea unui acid cu un fluorocrom; prin fluorescența indusă poate fi identificată localizarea antigenelor în celule.

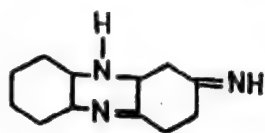
Microscopia prin fluorescență se deosebește de microscopia cu raze ultraviolete a cărui principiu de funcționare se bazează pe absorbția luminii ultraviolete de moleculele preparatului.

Microscopia în ultraviolet este asemănătoare spectrofotometriei, dar rezultatele sunt înregistrate fotografic. Razele ultraviolete trec prin lentile speciale și prin secțiunea preparatului de examinat dând, datorită unui fond diferit de absorbție, o imagine invizibilă pentru ochi dar care este înregistrată pe placa fotografică. Metoda este utilizată pentru detectarea acizilor nucleici, a bazelor purinice și pirimidinice ale nucleotidelor ca și la detectarea proteinelor ce conțin anumiți aminoacizi.

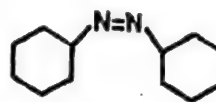
Grupările $-CH$, $-OCH_3$, $-CH_3$, $-CN$, măresc intensitatea fluorescenței, altele ca $-CO$, $-COO$, $-NO_2$ o slăbesc, ceea ce reduce gama preparatelor care pot fi vizualizate printr-o astfel de tehnică. Prin metodele de preparare a secțiunilor se pot elimina astfel de inconveniente, lărgind astfel posibilitatea de utilizare a microscopiei prin fluorescență.



antrachinonă



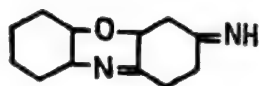
azină



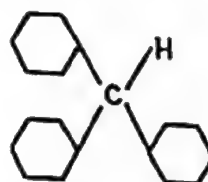
azoic



azometin



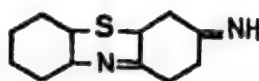
oxazină



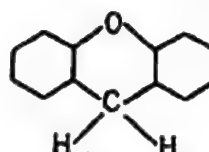
trifenilmetan



cetimină



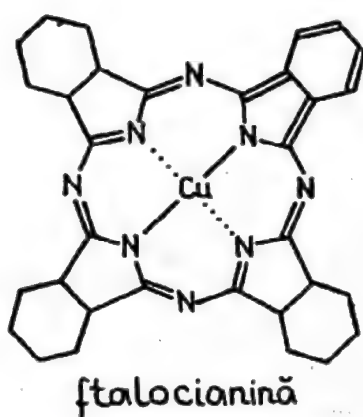
tiazină



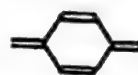
xantină



inadamin



ftalocianină



quinonă

Fig.5. Principalele grupări fluorofore

1.1.3. Microscopia în contrast de fază

Microscopia în contrast de fază utilizează un tip special de microscop

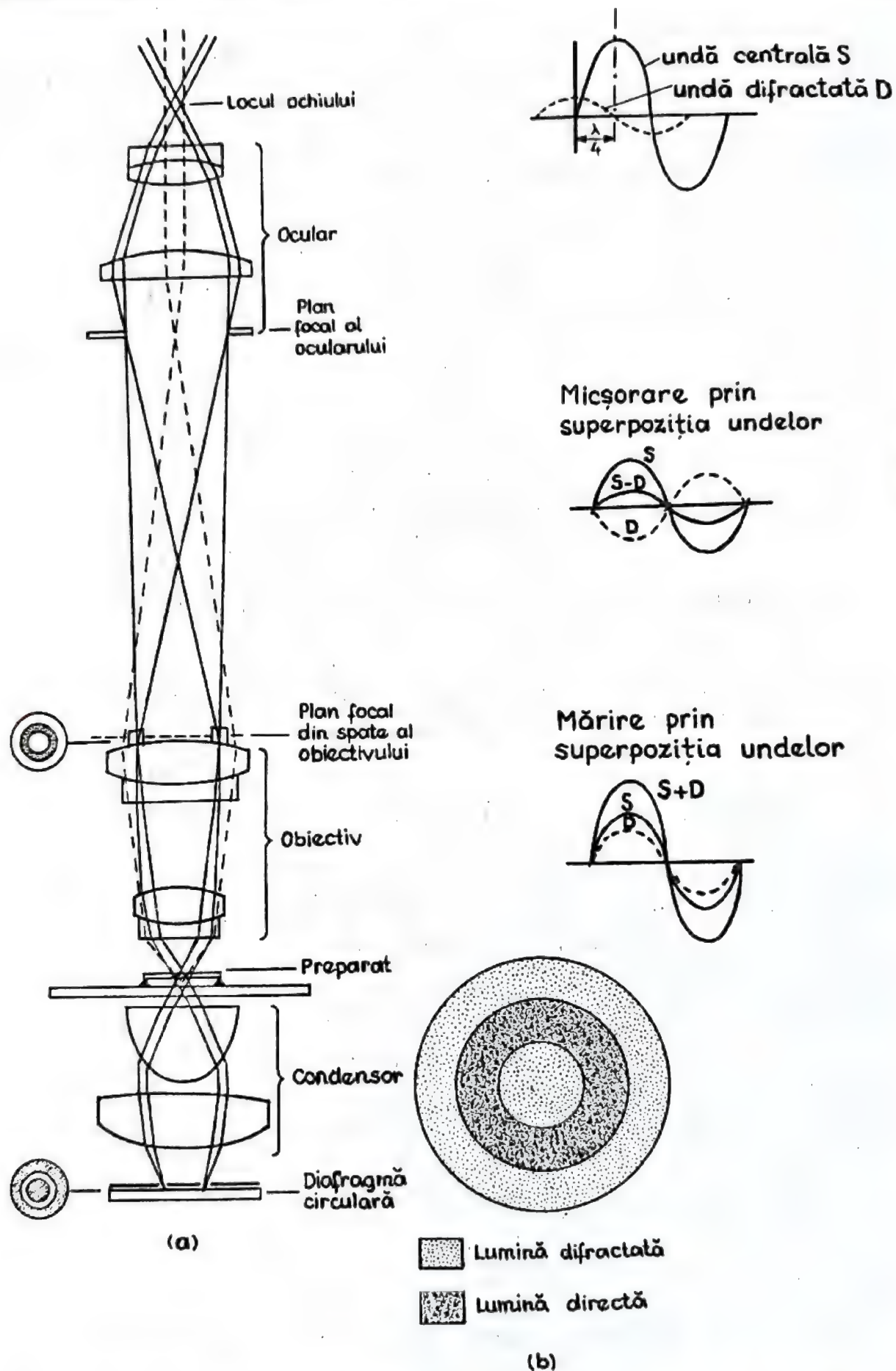


Fig.6. Schema de principiu a microscopului cu contrast de fază.

fotonic ce realizează contrastul unor obiecte de examinat, permițând astfel studiul celulelor în stare vie, nefixate și necolorate.

Aparatul pentru contrast de fază este un microscop obișnuit, cu următoarele particularități:

- **condensorul are un diafragm inelar** (un inel transparent într-un disc opac);

- **în obiectiv se găsește o placă sau inel de fază** care are rolul de a modifica transmisia unei părți din razele luminoase care formează imaginea câmpului microscopic (este un proces de defazare între razele luminoase care sunt transmise direct și cele care sunt difractate de preparat)

Aceste două particularități permit modificarea sistemului optic, adică **transformă diferențele de fază invizibile pentru ochi în diferențe de amplitudine care măresc contrastul elementelor preparatului.**

1.1.3.1. Tehnica de lucru

- se montează condensorul de contrast de fază în locul condensorului obișnuit;

- în locul obiectivelor microscopului propriu-zis, se înșurubează obiectivele de contrast de fază;

- într-unul din tuburile oculare se introduce microscopul ocular;

- se aduce în axa optică a microscopului obiectivul 10x sau de puterea de mărire cu care dorim să examinăm; prin rotirea inelului condensorului facem să concidă cifra de pe aceasta, care corespunde aperturii lui, cu apertura obiectivului folosit;

- privind prin pupila de ieșire a ocularului, se reglează microscopul ocular (apropierea sau îndepărtarea lentilelor care compun ocularul) până în momentul când în câmpul vizual apar clar conturate două inele (a diafragmei condensorului și a inelului de fază);

- cu ajutorul a două cheițe se acționează asupra șuruburilor de reglare ale condensorului până în momentul suprapunerii inelului din diafragma condensorului peste inelul din obiectiv - **reglajul se face pentru fiecare obiectiv în parte;**

- se înlocuiește microscopul ocular cu ocularul propriu-zis;

- se recoltează fragmente din ficat de șobolan care se pun pe o placă de sticlă; cu o lamă portobiect se fac amprente prin apăsarea ei pe fragmentele de ficat peste care se pun 2-3 picături dintr-un mediu de cultură; se acoperă cu o lamelă după care se așează preparatul pe platina microscopului;

- se pune la punct imaginea după tehnica descrisă la capitolul 1.1.1.4. și se examinează preparatul.

1.1.3.2. Aplicații practice

Microscopia în contrast de fază permite:

- studiul celulelor în stare vie (celulele nefixate și necolorate);
- scoate în evidență unele detalii de structură care nu se pot observa la microscopul fonic obișnuit ca endocitoza, mișcarea cililor și flagelilor, diviziunea celulară, etc.;

- studiază reacțiile celulare la diferiți agenți fizici sau chimici;
- studiază benzile cromosomilor.

Din microscopia cu contrast de fază au derivat:

- microscopia cu interferența care permite aprecierea cantitativă a masei unor componente tisulare;
- microscopia cu interferența diferențială utilă pentru a evalua proprietățile suprafeței celulare și a altor structuri biologice.

1.1.4. Microscopia în lumina polarizată

Prin această tehnică se obțin **imagini** ale unor **constituenți** în care **structurile examinate sunt anizotrope**, acestea făcând ca viteza de propagare a luminii polarizate să varieze cu direcția de propagare; mediile respective se numesc **birefringente**.

Birefringenta se poate clasifica:

a. în structurile fibrilare (**colagen, mielina, fibrele musculare striate**, etc.) poate exista o **birefrință pozitivă** când indicele de refracție este mai ridicat în lungime decât în plan perpendicular și **birefrință negativă**, în caz contrar (fibrele **nucleoproteice**).

b. **birefrința cristalină** sau intrinsecă observată în sistemele sau moleculele în care ionii prezintă un aranjament asimetric regulat și este independentă de indicile de refracție a mediului de montare; se observă în structuri constituite din **proteine sau lipide**;

c. **birefrința de formă sau structură** apare atunci când particulele submicroscopice sunt orientate regulat într-un mediu cu indice de refracție diferit;

d. **birefrința de tensiune** se observă la structurile izotrope care sunt supuse unei constrângeri mecanice și se întâlnește la nivelul **mușchilor** și în țesuturile **embrionare**;

e. dicroismul apare în momentul în care absorbția unei lungimi de undă dată de lumina polarizată variază în funcție de orientarea obiectului examinat. Aceste variații apar datorită diferențelor de intensitate (amplitudinea luminii transmise de obiect). Unii coloranți organici ca roșul de Congo sau thionină, pot induce dicroismul în unele structuri biologice datorită unei orientări preferțiale a moleculelor.

1.1.4.1. Microscopul cu lumina polarizată are două dispozitive speciale numite: **polarizor** și **analizor**; ele sunt constituite dintr-o peliculă de film polaroid sau dintr-o prismă Nicol în calcită.

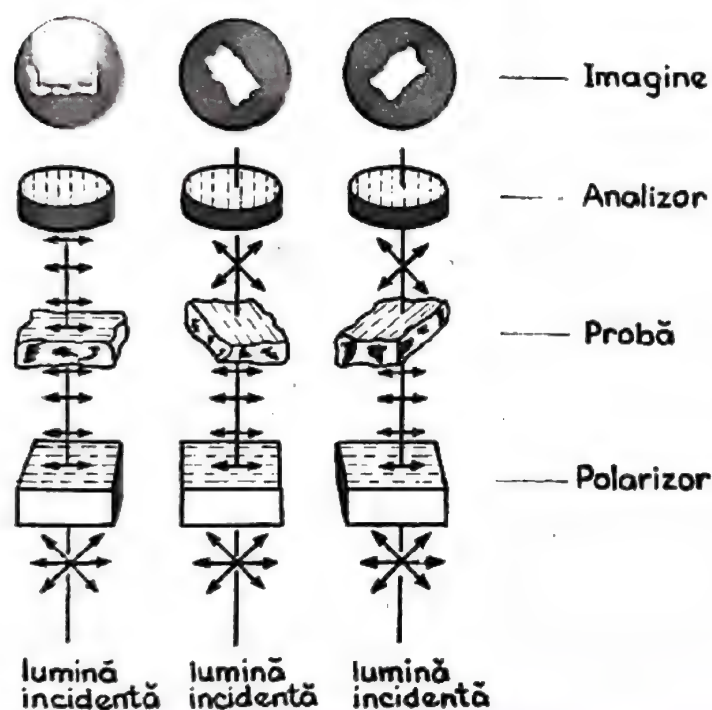


Fig.7. Schema optică a variațiilor luminoase de maxim și minim ale unui obiect anizotrop când este plasat între analizor și polarizor și rotit cu un unghi de $\pm 45^\circ$

Polarizorul se găsește sub condensator iar analizorul se afla deasupra obiectivului.

Dacă planul de polarizare al analizorului este perpendicular pe cel al polarizorului, lumina nu va fi transmisă. Punând pe platina microscopului un preparat birefringent, planul de polarizare va devia datorită întârzierii provocate de întreruperea probei de examinat. Învârtim preparatul până când în câmpul microscopului apar puncte cu luminozitate maximă și minimă.

1.1.4.2. Tehnica de lucru

- se coboară tubul microscopului apropiind obiectivul de condensor

până la obținerea unei iluminări maxime și uniforme a câmpului microscopic;

- se rotesc cei doi nicoli - analizorul și polarizorul - până când se obține întunecarea maximă în câmpul ocularului;

- pe platina microscopului se așează o lamă port obiect pe care sunt lipite secțiuni din rinichi, intestin sau ficat, colorate după metoda topo - optica Romanyi și col.1978 (materialul se fixează în formol, se secționează la microtomul de congelare iar secțiunile se colorează cu o soluție de albastru de toluidina la p.H. 4,5 urmând o post fixare cu fericianid de potasiu care are capacitatea de a se lega de lipidele și glicoproteinele din structura biomembranelor);

- imaginea se face clară prin tehnica descrisă la capitolul 1.1.1.4.

1.1.4.3. Aplicații practice

a. se pot studia structurile a căror compoziție chimică macromoleculară au un aspect liniar ca de exemplu **fibrele de colagen**, **mielina**, **fibrele musculare striate**, etc;

b. se utilizează pentru studiul structurilor: **membrane biologice**, etc.;

c. se evidențiază structurile cu simetrie radială - **granule proteice**, **lipide**, **colesterol**.

1.2. MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

Metoda difracției cu raze X furnizează informații de mare valoare științifică pentru biologie, dar este o metodă extrem de laborioasă, interpretarea datelor fiind ușurată astăzi de utilizarea computerului. Forțarea barierelor invizibilului cu consecințe aproape de nebănuit pentru științele biologice, s-a făcut după 1933, odată cu apariția microscopelor electronice.

Microscopul electronic constituie un exemplu de felul cum au fost aplicate în practică unele din marile descoperiri făcute în fizică la sfârșitul secolului trecut.

Aceste descoperiri au fost rodul a numeroase cercetări începute încă din 1750 iar printre ele, de o deosebită importanță pentru construirea diferitelor tipuri actuale de microscopie electronice, se consideră următoarele: descoperirea razelor X în 1895 de către W.C.Röntgen, demonstrarea existenței electronului în 1897 de către K.F.Braun, stabilirea caracterului ondulatoriu al electronilor și asemănarea acestora cu fotonii în 1924 de către Louis de Broglie, stabilirea rolului de funcționare ca lentilă a

câmpurilor electromagnetice cu simetrie axială asupra electronilor în 1926 de către Brusch, după ideea originală a lui Gabor. Toate aceste descoperiri au dus la fundamentarea opticii electronice ce stă la baza construirii microscopelor electronice a acceleratoarelor de particule, a tuburilor cinescopice.

Fizicianul francez Louis de Broglie a emis în 1924 ipoteza că electronii au proprietăți ondulatorii, adică le este asociată o undă, din acest punct de vedere asemănându-se cu fotonii. Această lungime de undă a electronului se numește "lungime de undă Broglie" și este dată de formulă:

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

λ = lungimea de undă a electronilor;

h = constanta lui Planck;

v = viteza electronului

m = masa electronului

Prin aceasta de Broglie a demonstrat asemănarea dintre radiațiile electronice și cele luminoase.

În toate tipurile de microscop electronice, electronii generați de un tun electronic și supuși unor tensiuni de accelerare la alegere, sunt focalizați și dispersați pentru a forma o imagine prin trecerea lor prin câmpuri electrostatice sau electromagnetice în funcție de tipul constructiv de microscop. Lungimea de undă a fasciculului de electroni este aleasă în funcție de tensiunea de accelerare, de la 0,0859 Å la 20 kV, la 0,0028 Å la 400kV, permițând explorări în microcosmosul celular până la nivel molecular. Cele mai perfecționate microscop electronice aflate în exploatare în diferite laboratoare au rezoluții garantate de 2-3 Å (în condiții speciale 1,2 Å și putere maximă de mărire pe placa fotografică de 800.000x).

Microscopurile electronice existente se împart după tipul de construcție și destinația lor în câteva grupe:

1. Microscop electronice de transmisie, sau prescurtat TEM (Transmission Electron Microscope), utilizate pentru cercetări ultrastructurale.

2. Microscop electronice de baleiaj, sau de tip SEM (Scanning Electron Microscope), folosite la studiul ultramorfologiei suprafețelor cu ajutorul electronilor secundari sau reflectați.

Tipul de imagine	
- cu electroni secundari	relief geometric sau topografic potențial de distribuție rata de emisie electronică
- cu electroni reflectați	relief geometric
- cu electroni absorbiți	compoziție (numărul atomic mediu)
- cu forțe electromotrice	compoziție (numărul atomic mediu)
- cu electroni transmiși	caracteristici fizice și electrice ale semiconductorilor
- cu catodoluminiscență	structura internă distribuția și concentrația materialelor fluorescente

3. Microscopice electronice de transmisie și baleiaj, **STEM** (Scanning Transmission Electron Microscope), ce permit studiul **ultrastructural** prin transmisie de electroni și al **suprafețelor** prin electroni secundari sau reflectați pe principiul SEM.

4. Microscopice electronice analitice de transmisie, **TEAM** - folosite pentru cercetări simultane **ultrastructurale** și **analitice**.

5. Microscopice electronice sistemice - aparate cu funcționalitate de sistem ce permit cercetări multiple simultan pe același preparat.

6. Microscopice electronice cu fotoemisie, **PEM** (Photoelectron Emission Microscope) cu aceleași aplicații ca și cele de tip SEM.

7. Microsonde electronice - **EPI** (Electron Probe Instrument) - utilizate în analize elementare și în studiul suprafețelor.

8. Microscopice ionice cu emisie de câmp, **FIM** (Field Ion Microscope) - cu ajutorul cărora se poate vizualiza direct orientarea atomilor într-un material.

1.2.1. Microscopul electronic de transmisie - TEM

Microscopia electronică prin transmisie este determinată, pe de o parte de interacțiunea **câmpurilor electromagnetice** produse de lentile cu electronii, influențând **parametrii electronooptici** și, pe de altă parte de interacțiunea electronilor cu proba. Pentru ca electronii să poată traversa proba este necesară o grosime suficient de mică a ei și totodată energii de accelerare suficient de mari ale electronilor.

Din acest punct de vedere deosebim microscopice electronice de transmisie convenționale **CTEM**, a căror tensiuni de accelerarea electronilor este cuprinsă între **20-125 kV** (pentru probe biologice se folosesc în mod

curent tensiuni de 80 kV) și microscop de voltaj înalt HVEM, ale căror tensiuni ajung la 3 MV (3000 kV) și chiar mai mult.

O secțiune transversală printr-un microscop electronic (fig.8) relevă o serie de elemente constructive ca: sistemul de vidare, tunul electronic, camera probei, ecranul fluorescent, dispozitivul de fotografiere și blocurile speciale pentru alimentarea electrică. Datorită complexității sale tehnologice de a menționa un fascicul de electroni cu un diametru de $1-2 \mu\text{m}$ în condițiile de paraxialitate impuse de legile opticii pe o lungime de cel puțin un metru, putem distinge în cadrul microscopului electronic mai multe etaje, la fel de importante în funcționarea lui. Într-o astfel de clasificare evidențiem:

- A. sistemul electronoptic;
- B. sistemul electronic și consola de comandă;
- C. sistemul de vid.

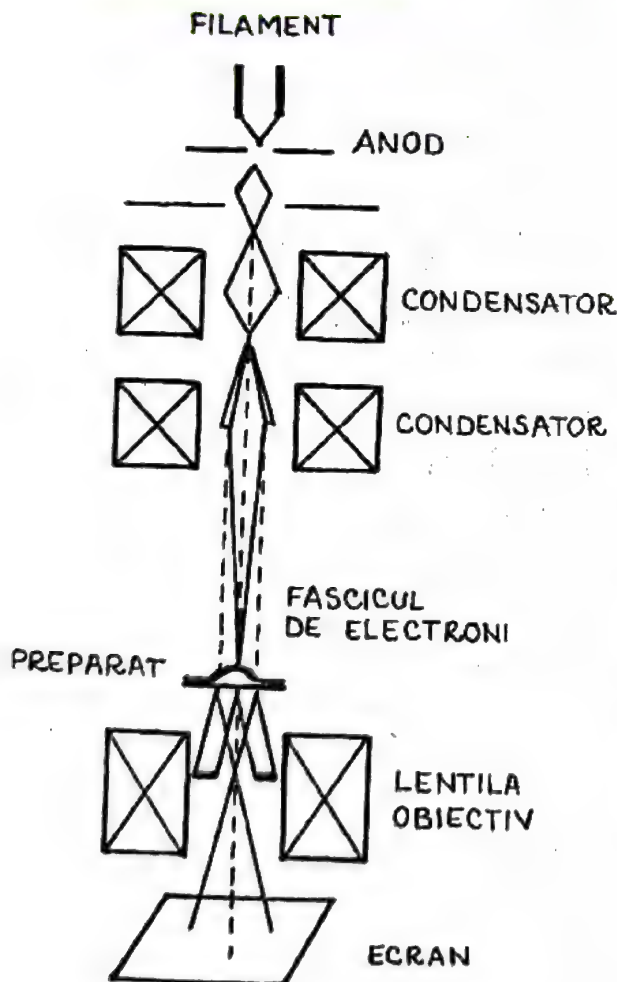


Fig.8. Schema de construcție a unui microscop electronic de transmisie.

1.2.1.1. Sistemul electronoptic

Sistemul electronoptic sau sistemul responsabil de realizarea

imaginii, localizat în coloana microscopului, este alcătuit din:

- sistemul de iluminare;
- camera pentru preparat;
- sistemul de formare a imaginii;
- camera de observație;
- camera fotografică.

Principal, realizarea imaginii la microscopul electronic nu diferă de microscoparele obișnuite, fotonice (fig.9).

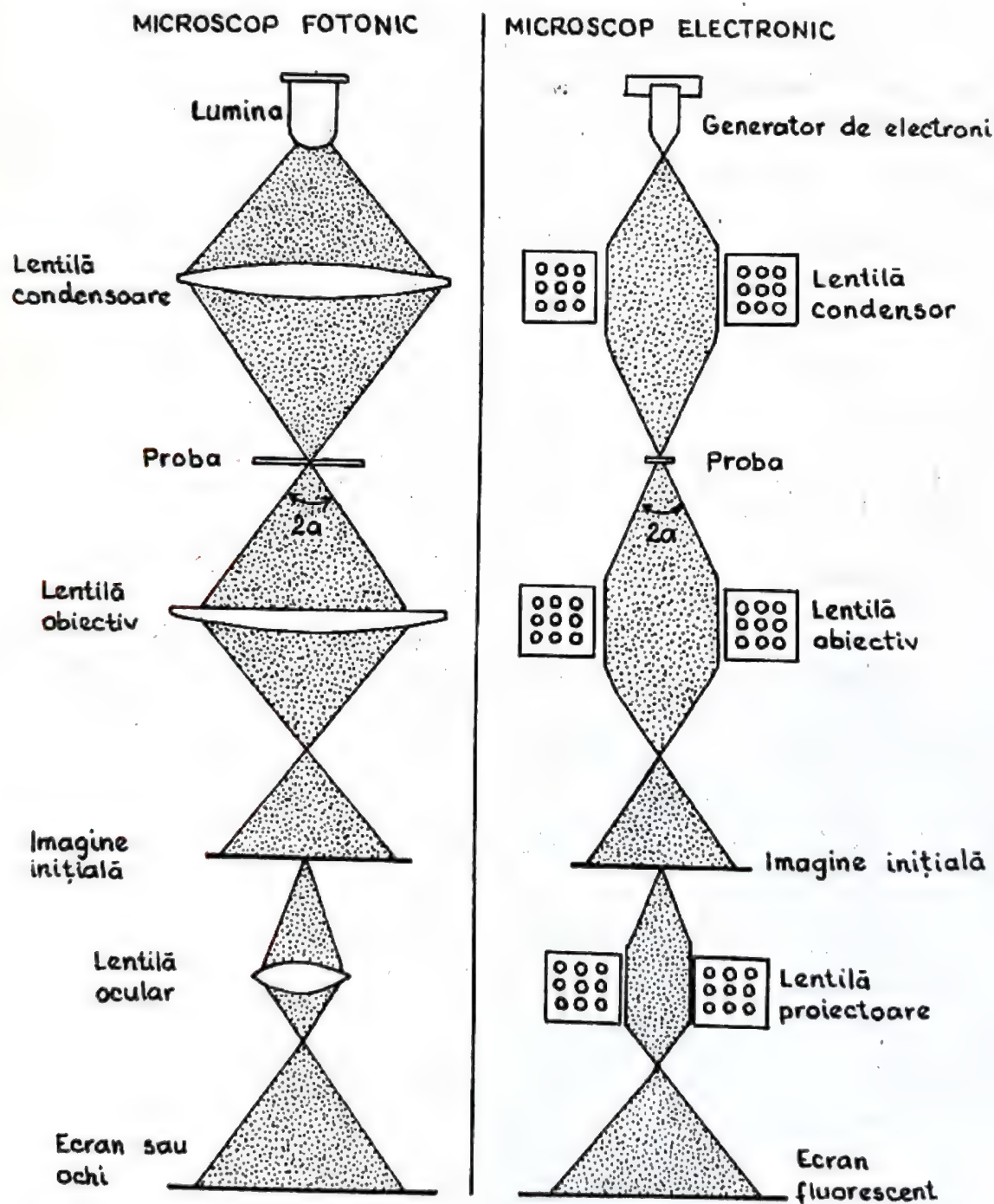


Fig.9. Realizarea comparativă a imaginilor în microscopia fonică și electronică.

Astfel, ca și la microscopul fotonic, este necesară o sursă de radiații tot de natură electromagnetică, așa numita **radiație X** a cărei lungime de undă este însă de $10^5 - 10^6$ mai mică decât a radiației verzi, aflată la jumătatea spectrului vizibil ($\lambda_X = 0,1-0,01 \text{ \AA}$, $\lambda_V = 5500 \text{ \AA}$), deci sub $0,1 \text{ \AA}$ ceea ce va permite detalieri morfostructurale de ordinul angströmului. Reamintim că scara de 1 \AA este scara atomică.

a. În componența sistemului de iluminare intră: 1. **tunul electronic** și 2. **lentilele condensor**, sistemul având rolul asigurării unei străluciri optime pentru diferite trepte de mărire la anumite grosimi ale preparatului.

Tunul electronic, adică ansamblul **catod-filament**, **cilindru Wehnelt** și **anod**, este plasat în partea cea mai de sus a coloanei microscopului, în prelungirea cablului de înaltă tensiune. Filamentul, care joacă rol de **catod**, realizat din **tungsten**, **wolfram** sau hexaborură de lantan, sub forma literei V este sursa de **radiații X** și se găsește în vecinătatea **cilindrului Wehnelt**, **electrodul cu rol de focalizare** și care se aseamănă întrucâtva cu cel al grilei dintr-o triodă, tetrodă sau pentodă. **Anodul**, în general, este confecționat dintr-un **disc metalic** având un orificiu central cu diametru $3-5 \text{ mm}$, care dirijează electronii în **axul optic** al coloanei microscopului. Energia ridicată a electronilor necesară traversării secțiunilor preparatului se realizează prin aplicarea unei **tensiuni de accelerare anod - catod**, specifică tipului de microscop, dar și naturii și grosimii probelor.

Lentilele condensor servesc la **focalizarea fasciculului electronic** pe probă, și constau dintr-un ansamblu de **două lentile**, prima cu distanță focală scurtă care creează o imagine micșorată a sursei de electroni, deci a filamentului, a doua cu distanță focală mărită, care transferă imaginea micșorată în planul obiect. În cazul utilizării microscopului la rezoluții înalte, un rol decisiv îl joacă lentila condensor, fiindcă densitatea iluminării preparatului trebuie să fie foarte mare. Acest lucru se realizează prin treptele de iluminare prevăzute condensorului 2. Pentru compensarea aberațiilor optice care sunt prezente și în microscopia electronică, lentilelor condensor li se adaugă sisteme de **corectare și compensare** (deflectorul, stigmatorul și compensorul de deplasare).

b. **Camera probei** este spațiul din interiorul coloanei microscopului, dintre **lentilele condensor** și lentilele de formare a imaginii, **mărginită de două difragme**. Accesul se face printr-o **cameră ecluză** pentru adaptarea presiunii la cea ambientală sau la vidul din coloană, iar proba, introducându-se într-un orificiu în lungul axului optic prevăzut în măsura preparatului. Secțiunile realizate dintr-un țesut, sunt fixate **pe grilă** și manipulate prin intermediul **portobiectului** în afara și interiorul camerei, fluxul de particule lovind perpendicular suprafața secțiunilor în toată grosimea lor, producând

astfel **difracția razelor X**. Fluxul inițial, omogen, este astfel "modulat" la trecerea prin grosimea secțiunii, reținând astfel informațiile morfostructurale necesare.

c. *Sistemul de formare a imaginii* este realizat prin intermediul a trei sau patru lentile: **obiectiv**, **intermediară** (1 și 2 la microscopul mai perfecționat) și **proiector**, toate, ca și cele condensor, fiind de tip electromagnetic.

Datorită faptului că radiatiile X sunt sarcini electrice iar sticla nu le poate modifica traiectoria, problema construcției unor lentile pentru un

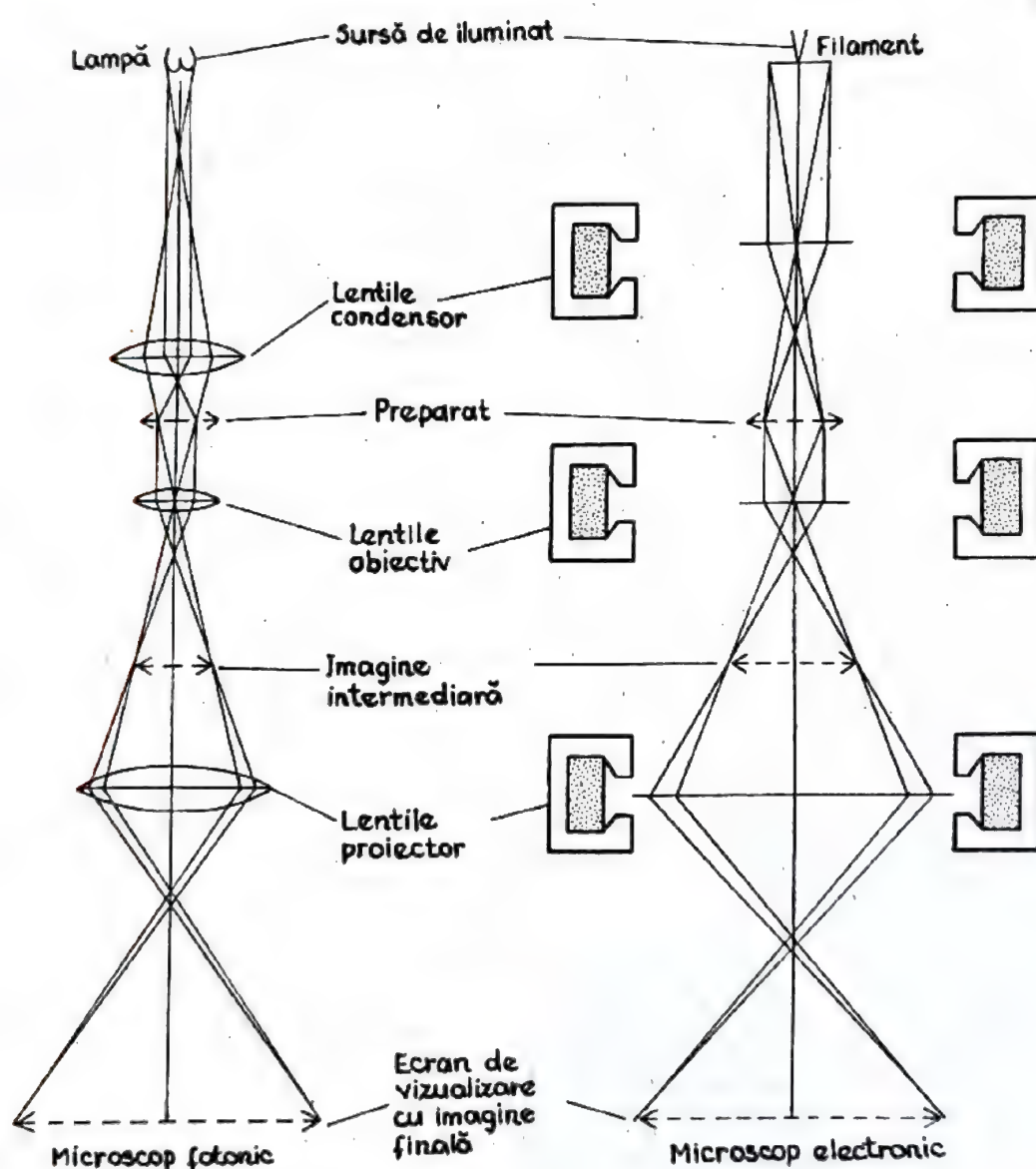


Fig.10. Mersul razelor luminoase și a radiatiilor X în microscopia fonică și electronică.

astfel de fascicul a fost rezolvată prin utilizarea unui câmp electromagnetic, cu simetrie axială.

Problema de bază în cazul microscopelor constă în asigurarea unei distanțe focale variabile a sistemului, care să permită vizualizarea diferitelor grosimi ale secțiunilor probei sau mărirea unor detalii de interes. În cazul microscopelor fotonice acest lucru se realizează prin modificarea mecanică a poziției celor două lentile, (obiectiv și ocular) una față de alta astfel încât sistemul să se poată alinia optic. În cazul utilizării radiației X, atât câmpul electric cât și cel electromagnetic realizat cu magneți naturali, deși pot constitui lentile, ele nu pot să modifice distanța focală, lucru în schimb perfect posibil cu ajutorul solenoidelor, prin modificarea curentului străbătut în circuit. Din punct de vedere tehnologic există o diversitate de realizare a lentilelor electromagnetice, piesele polare fiind detașabile sau monobloc. Traectoria razelor X prin lentilele microscopului se poate urmări în figura 10, imaginea realizându-se pe un ecran fluorescent, în urma interacțiunii electronilor difracți de către probă cu substanța fluorescentă a ecranului.

d. Camera de observație, situată la nivelul panoului de comandă este prevăzută cu trei ferestre de vizualizare a imaginii, fiind în partea superioară în legătură cu lentila proiector, iar în partea inferioară cu caseta fotografică. În interiorul ei se află ecranul care este format dintr-o placă metalică circulară acoperită cu o substanță fluorescentă, cum ar fi monocristale de sulfură de zinc și cadmiu.

e. Camera fotografică se găsește sub camera de observație și este prevăzută cu o casetă cu 12 sau 24 de plăci fotografice a căror emulsie este specifică radiației X. Camera are un sistem de vidare fiind de fapt în conexiune directă cu coloana microscopului. Astfel, este posibilă înmagazinarea imaginilor, mărirea și prelucrarea lor ulterioară prin tehnicile fotografice cunoscute, îmbunătățind deci calitatea informației.

1.2.1.2. Sistemul electronic și consola de comandă

Sistemul electronic, deosebit de important, este alcătuit în principal la microscopele moderne din două blocuri: unul responsabil de realizarea unei tensiuni înalte, bine stabilizate, care să permită obținerea rezoluției propuse, sub 10 Å, al doilea fiind responsabil de realizarea unui curent bine stabilizat pentru alimentarea lentilelor, micșorând pe cât posibil aberațiile lor. Evident că accesarea luminii, rezoluției și clarității imaginii se realizează electronic prin consola de comandă situată pe un panou frontal.

1.2.1.3. Sistemul de vid

Pentru a împiedica interacțiunile dintre radiațiile X și moleculele de aer, deci obținerea unui fascicul coerent cu o deplasare perfect rectilinie până la ecranul fluorescent, este necesară realizarea în coloana microscopului a unui vid înalt de aproximativ 10^{-4} - 10^{-6} torr și chiar mai mult. Sistemul de vidare conține una sau două pompe rotative care asigură un vid preliminar și una de difuzie care ridică vidul la cotele cerute de rezoluția microscopului. Totodată, sistemul conține o serie de supape manuale și automate cu rol de protecție în timpul utilizării instrumentului.

1.2.2. Microscopul electronic cu voltaj înalt

Microscopul electronic cu înalt voltaj (HVEM) este un microscop de transmisie ce folosește o tensiune mai mare de 300.000 V, ajungând, la unele tipuri, până la 3-5 MeV.

Primul microscop electronic cu o tensiune de accelerare de 1 milion de volți (1 MV) a fost construit în 1960 de către Dupony și Perrier în laboratorul de optică electronică din Toulouse, această realizare constituind punctul de plecare pentru o nouă generație de microscopice electronice.

În ciuda complexității lor și a costului ridicat ele s-au dovedit extrem de utile, deoarece într-un astfel de microscop electronii pot trece prin preparate care au grosimi de $14 \mu\text{m}$, fiind posibil ca secțiuni de grosimea celor realizate de un microtom obișnuit să fie ușor examinate, uneori fără a mai fi colorate. De asemenea se pot cerceta celule întregi fără a fi incluzionate, iar Porter și Fotino (1974) au demonstrat că în aceste condiții se poate realiza mai ușor reconstituirea tridimensională a structurilor și evidențierea enzimelor.

Folosindu-se microscopul electronic Toulouse 3000 cu o tensiune de accelerare de 1 MV s-au obținut fotografii ale unor bacterii, ale moleculelor de acizi nucleici. De asemenea, utilizându-se un alt tip de microscop electronic cu voltaj înalt JEM 1000 D, s-a reușit urmărirea evoluției cromozomilor în meioză. Rezultatele obținute până în prezent în cercetarea biologică arată că microscopia de înalt voltaj va avea mari perspective în viitor.

Acest tip de microscop se bazează pe același principiu constructiv ca și la microscopicele convenționale de 100 kV. Înalta tensiune utilizată presupune însă realizarea unei coloane cu mult mai înaltă, iar înlăturarea vibrațiilor din coloană necesită și realizarea unei fundații cu mult mai stabilă decât în mod obișnuit. Astfel, întreg ansamblul poate atinge înălțimea unei

clădiri pe trei nivele. La fel, lentilele sunt mai puternice iar curentul absorbit de ele și de sistemul de accelerare a fluxului conduc la utilizarea unor blocuri de alimentare electrică mai perfecționate și mai costisitoare. Sunt necesare de asemenea, măsuri de securitate sporite pentru evitarea iradierii personalului.

1.2.3. Microscopul electronic analitic de transmisie - TEAM

TEAM este format dintr-un microscop electronic de transmisie de înaltă rezoluție, la care se atașează un microanalizor de raze X din clasa spectrometrelor.

Noutatea adusă de TEAM constă în posibilitatea de a culege și informații cu privire la elementele chimice cuprinse în preparat, pe lângă cele de ordin morfo-structural, prin difracție de electroni conținute de CTM.

El funcționează pe baza analizei lungimii de undă dispersate, sau mai nou pe baza analizei energiei dispersate. Astfel, bombardarea printr-un fascicul de electroni a unor preparate determină emisia de radiații X a căror lungime de undă este caracteristică atomilor bombardați; spectrometrul măsoară aceste lungimi de undă, permițând determinarea compoziției chimice elementare a unor volume extrem de mici de materie.

Până în prezent s-au conturat câteva direcții de cercetare, prin utilizarea TEAM, cum ar fi:

1. localizarea elementelor chimice existente în condiții normale în țesuturi, în special a ionilor de Na^+ și K^+ ;
2. detectarea unor elemente în anumite stări patologice cum ar fi de ex.: intoxicațiile sau carențele fiziologice;
3. aprecierea distribuției unor elemente poluante în diferite verigi ale lanțului biologic;
4. identificarea unor reacții chimice între diferite elemente pe baza analizării unor precipitate ce se formează în țesuturi.

1.2.4. Microscopul electronic de baleiaj - SEM

SEM spre deosebire de TEM furnizează imagini tridimensionale ale suprafețelor probelor cercetate, ale căror dimensiuni sunt de ordinul centimetrilor, dar nu pot furniza informațiile morfo-structurale ce se regăsesc în grosimea materialului.

Formarea imaginii (fig.11) se bazează pe principiul emisiei

electronilor secundari, reflectați în urma bombardării probei de către fasciculul primar de radiații X.

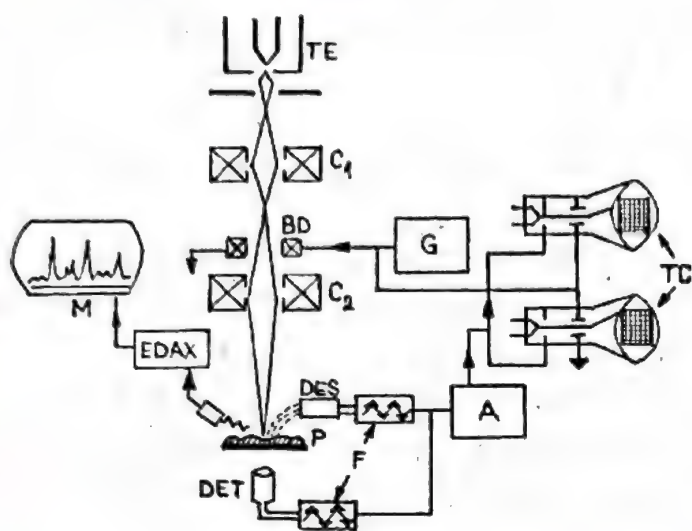


Fig.11. Schema de organizare a microscopului electronic de baleiaj - SEM)

De această dată, fasciculul de electroni cade sub un anumit unghi pe probă producând reflexii sub unghiuri diferite în funcție de incidența particulei cu zona de impact. Spotul de radiații baleiază în timp întreaga suprafață a probei, astfel încât pe ecran apare imaginea, la scară dorită, a zonei scanate.

Constructiv, SEM are în plus un detector al electronilor secundari emiși în urma interacțiunii cu suprafața probei. Curentul produs de acesta este modulat și trimis în final spre blocul de baleiere al unui tub cinescopic dintr-un monitor.

Pregătirea probei pentru analiza cu un astfel de microscop este mai ușoară, nefiind necesare realizarea de secțiuni ultrafine. Pe de altă parte, rezoluția este mai mică cam de 10 ori față de TEM. Condiția principală impusă probelor examinate printr-o astfel de metodă este ca suprafața acestora să fie conductoare pentru evitarea acumulării de sarcini electrice pe suprafață. În cazul unei analize calitative, probele sunt tăiate și polizate mecanic sau chimic. În cazul unei probe la care se impune studiul morfostructural de suprafață sau al compoziției, suprafața probei trebuie pregătită în prealabil. Totodată, probele neconductoare se acoperă cu un strat fin de ordinul de Å grosime, după prin evaporare în vid, stratul realizând astfel neutralitatea electrică a suprafeței impusă de condițiile specifice de lucru în microscopia de baleiaj.

Pentru obținerea unei depuneri uniforme a stratului în cazul probelor

a căror suprafață este rugoasă, acestea sunt supuse rotirii sub anumite unghiuri în tot timpul depunerii. Stratul depus este o vopsea pe bază de argint coloidal, observarea fiind ameliorată prin depunerea de straturi succesive de Au și Pd, grosimea totală nedepășind 1000 de Å. În cazul probelor biologice care conțin apă și lichide volatile și care sunt supuse evaporării în timpul baleierii datorită vidului existent în coloană, este necesară, în prealabil, ca și în microscopia de transmisie, deshidratarea și eventual înghețarea lor, înlăturând, astfel, efectele nedorite.

II. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA FOTONICĂ

Studiul structurii celulelor eucarioate, de o deosebită complexitate morfo - funcțională, este posibil de realizat doar într-o mică măsură cu microscopul fonic deoarece are o putere de rezoluție redusă.

Acest studiu necesită utilizarea unor tehnici speciale de citomorfologie, citochimie, citoenzimologie, etc., a căror atribut este conservarea integrității structurale în condiții cât mai apropiate de cele existente în organismul viu.

Examinarea morfo - funcțională a celulelor se face pe preparate microscopice. Un preparat microscopic este format din: secțiuni subțiri, plane și transparente, de organe sau țesuturi, frotiuri sau amprente de organe, așezate pe o lamă de sticlă sau portobiect cu laturi paralele și dimensiunile 76/26 mm și 1,5 - 2 mm grosime, protejate cu o lamelă de sticlă de formă pătrată sau dreptunghiulară, cu dimensiuni variabile de 18/18, 22/22, 22/32 mm și o grosime de 0,16 - 0,18 mm. Înainte de a fi folosite, atât lamele cât și lamelele vor fi bine curățate și degresate (detergenți, alcool etilic).

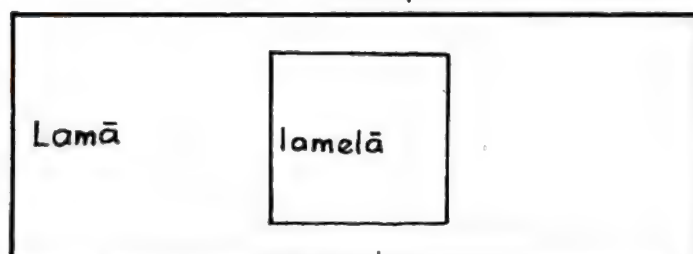


Fig.12. Lamela și lama portobiect

Preparatele microscopice se clasifică în:

1. *Preparate permanente* sau durabile care permit un studiu amănunțit al celulelor pe secțiuni fixate și colorate; ele rezistă în timp și se pot realiza prin:

- a. metoda efectuării secțiunilor fine;
- b. metoda etalării metarialului biologic în monostrat (frotiu, amprente de organe)

Obținerea unor preparate microscopice permanente necesită efectuarea unor timpi operatori succesivi, fiecare din ei având o influență hotărâtoare asupra reușitei finale. În ordinea executării lor, aceștia sunt: recoltarea,

fixarea, spălarea (decalcifierea în cazul ţesuturilor dure), includerea, secţionarea, aplicarea secţiunilor pe portobiect, colorarea, montarea şi etichetarea. În funcţie de tehnica aleasă, succesiunea acestor timpi poate fi modificată, unii dintre ei putând fi omişi.

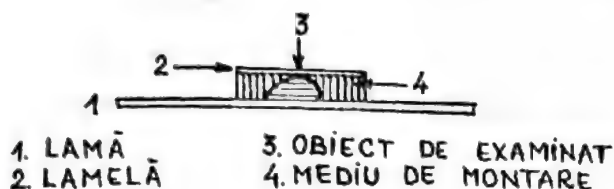


Fig.13. Elementele unui preparat microscopic permanent

Dacă unele greşeli în efectuarea secţionării, colorării sau montării mai pot fi ulterior corectate parţial, recoltarea, fixarea şi includerea incorrect făcute, compromit definitiv calitatea preparatelor microscopice.

2. *Preparate extemporanee*, proaspete sau temporare.

2.1. METODA EFECTUĂRII SECŢIUNILOR FINE

Realizarea unui preparat microscopic permanent prin metoda efectuării secţiunilor fine necesită o anumită tehnică care se desfăşoară în următoarele etape: recoltare, fixare, spălare, includerea, secţionarea, etalarea materialului biologic pe lamă, colorarea, montarea şi etichetarea.

2.1.1. *Recoltarea*

Recoltarea reprezintă unul din timpii cei mai dificili din tehnica de biopsie celulară deoarece după sacrificarea animalului de experienţă sau obţinerea unui fragment de ţesut sau organ prin biopsie sau alt act operator, cu maximum de operativitate trebuie să confecţionăm o piesă de material biologic care să conţină populaţia de celule necesară studiului propus.

Recoltarea materialului biologic din organismele vii se poate efectua prin:

a. Biopsie - se prelevă prin secţionare un fragment mic de ţesut (ex. biopsie ganglionară, cutanată, musculară).

b. Puncţie bioptică - se obţin fragmente dintr-un ţesut cu ajutorul unui tub ascuţit - trocar - ex. puncţie sternală pentru obţinerea unor fragmente din măduva hematopoietică, puncţie hepatică, renală, ganglionară.

c. Aspiraţie endoscopică - pentru recoltarea cu ajutorul unui endoscop

a produselor biologice existente în cavitățile naturale (ex. endoscopie gastrică).

d. Puncția cavităților - pentru obținerea secrețiilor normale sau patologice ca: lichide pleurale, peritoneale, oxitice, lichid cefalorahidian.

e. Raclarea mucoaselor - (supeficială sau profundă) pentru recoltarea materialului din cavitatea uterină, vaginală, faringe, cavitatea bucală, etc.

f. Prelevarea intraoperatorie - se efectuează în timpul unei intervenții chirurgicale pentru stabilirea unui diagnostic imediat.

g. Recoltarea de material biologic de la cadavrele umane - secționarea unor fragmente de organ pentru examinarea lor.

h. Recoltarea de la animalele de experiență sacrificate în acest scop.

Deasemenea pentru studiul unor aspecte ale activității celulare (mișcarea, fagocitoză, diviziune celulară etc.) se realizează și preparate din culturi celulare.

Recoltarea se face pe o placă de plută sau de P.V.C. foarte curată; se folosesc pense fine, fără dinți, care se manipulează cu delicatețe pentru a nu strivi preparatul; în aceleși scop, la fasonarea pieselor se folosesc lame de ras noi, degresate.

În cazul în care țesutul are o consistență moale (sistem nervos central, testicol) și fasonarea pieselor nu se poate face fără riscul strivirii lor, se preferă fixarea unor fragmente mai mari timp de 1-2 ore, perioadă în care structurile superficiale se întăresc și permit obținerea lor.

Piese astfel recoltate trebuie să aibă fețele plane și paralele iar grosimea lor nu trebuie să depășească 1-4 mm, aceasta facilitând pătrunderea mai rapidă a fixatorului și evită apariția alterărilor post-mortem.

2.1.2. Fixarea

Fixarea, timp obligatoriu în realizarea preparatelor permanente, are drept scop esențial conservarea, (imobilizarea) constituenților celulari într-o stare cât mai apropiată de starea vie și de pregătirea lor în vederea manevrelor ulterioare (incluere, colorare). Aceasta depinde în primul rând de proteine, principalii constituenți ai materiei vii ceea ce înseamnă că un bun fixator histologic trebuie să fie în primul rând un fixator al proteinelor.

Mecanismul intim al fixării proteinelor nu este încă perfect cunoscut. Se cunoaște însă faptul că, fixatorii histologici determină o coagulare sau o insolubilizare a proteinelor și în majoritatea cazurilor, un anumit grad de polimerizare a acestor elemente organice. De ex. formaldehida, element principal al fixatorilor uzuali se combină cu numeroase grupări funcționale a

moleculelor proteice, formează legături între moleculele învecinate și constituie astfel edificii macromoleculare insolubile.

O altă consecință importantă a acestei cuagulari a proteinelor este blocajul reacțiilor enzimatic pe care le antrenează, împiedicând astfel distrugerea autolitică a țesuturilor.

Fixarea trebuie privită diferit în funcție de:

1) gradul conservării morfologice pe care dorim să-l obținem: fixarea se realizează în mod diferit pentru microscopia electronică față de cea fotonică; în primul caz trebuie păstrate relațiile între constituienții chimici ai celulei la scară moleculară ceea ce nu este indispensabil în același grad pentru microscopia fonică;

2) de natura constituienților chimici ce trebuie conservați: anumite edificii macromoleculare sunt ușor de conservat (este cazul constituienților celulari fundamentali cum sunt proteinele) în timp ce alții, foarte labili, sunt extrem de dificili de fixat (de ex. ozele sau oligozaharidele);

3) de volumul fragmentelor tisulare ce trebuie conservate: problema fixării unui frotiu celular este diferită de cea a fixării unui organ de șoarece sau a unui encefal uman; viteza de pătrundere a fixatorului devenind în acest caz elementul esențial al fixării;

4) de tipul reacțiilor de culoare sau histochimice pe care dorim să le efectuăm: nu vom fixa în același fel când vom folosi o colorație simplă "topografică" sau vom încerca decelarea lipidelor sau enzimelor.

Un bun fixator citologic trebuie să întrunească următoarele calități

- să pătrundă rapid în țesut; ✕
- să producă o retracție cât mai mică a pieselor evitând modificarea taliei, forme și raporturilor dintre celule; ✕
- să permită o bună includere; ✕
- să permită o bună colorare a structurilor a căror evidențiere se dorește; ✕
- fixarea se realizează prin:
 - 1) agenți fizici
 - 2) agenți chimici

2.1.2.1. Fixarea prin agenți fizici

În acest capitol se încadrează metodele ce folosesc căldura, desicarea la temperaturi scăzute (congelare-desicare sau criodesicare), desicarea la temperatura laboratorului, metodele ce presupun răcirea preparatului biologic urmată de acțiunea unui fixator lichid (congelare-substituție), răcirea

nereprezentând un procedeu de fixare, ea având ca efect oprirea proceselor de autoliză; această oprire a modificărilor postmortem încetează însă odată cu revenirea la temperatura laboratorului, ceea ce face imperios necesară completarea cu o fixare în adevăratul sens al cuvântului.

2.1.2.1.1. Fixarea prin căldură

Acest tip de fixare mult depășit în prezent de alte metode, îl cităm doar pentru importanța sa istorică. Este una din cele mai vechi metode de fixare; principiul ei este coagularea proteinelor sub efectul căldurii. Însă, chiar autorii clasici au observat inconveniente pe care le prezintă din punct de vedere morfologic acest tip de denaturare a compușilor protidici. Una din principalele aplicații ale fixării prin căldură, a fost introdusă de Erlich în 1877, și se referă la pregătirea frotiului de sânge pentru colorarea cu amestecul triacid cunoscut.

2.1.2.1.2. Fixarea prin desicare la temperatura laboratorului

Desicarea rapidă la temperatura laboratorului este folosită pentru pregătirea frotiului de sânge destinat colorării cu metodele hematologiei morfologice. Ea poate fi aplicată și pentru frotiuri de măduvă osoasă și amprente de organe. În afara acestor situații particulare, indicațiile sale sunt destul de limitate, nefiind vorba de o veritabilă fixare. Denaturarea proteinelor obținută astfel nu merge până la pierderea solubilității lor în apă, astfel că desicarea trebuie totdeauna completată în momentul colorării frotiurilor prin acțiunea unui alt fixator (ex. alcool metilic ce se folosește ca solvent pentru eozinatul de albastru de metilen din compoziția colorantului May-Grünwald).

2.1.2.1.3. Fixarea prin desicare la temperatură scăzută

A fost introdusă în 1890 de Altman iar perfecționările acestei metode de fixare făcute de Gresh (1932) au dus la rezultate citologice spectaculare (Bensley și Gersh - 1933).

Congelarea - desicarea sau criodesicarea nu este o fixare în sensul propriu al termenului pentru că ea nu determină denaturarea proteinelor tisulare. Principiul ei este foarte simplu, bazându-se pe eliminarea prin sublimare a apei conținute în piese, răcire la o temperatură inferioară de 0° și plasarea într-o incintă unde presiunea este inferioară valorii de 4,6 mm Hg

(coloană de mercur). Numeroasele aplicații industriale ale metodei justifică numărul mare de lucrări consacrate principiilor fizice și realizării tehnice a acestei metode. Metoda a fost pusă la punct în 1958 de către Neumann iar lucrările lui Lison și Pearse (1960) trec în revistă datele esențiale în ceea ce privește locul criodesicării în tehnica citologică. Din punct de vedere tehnic metoda fixării prin criodesicare are trei etape:

✕ 1. *congelarea piesei* care are drept scop principal oprirea rapidă a tuturor reacțiilor vitale, ceea ce se poate obține prin folosirea unei temperaturi de -50° - -70° ; la această temperatură se obține oprirea reală a tuturor reacțiilor enzimatice ce s-ar putea derula în interiorul țesuturilor.

Congelarea reprezintă etapa crucială a acestei metode: - defecțiunile acestei etape pot duce la artefacte grosiere reticularea țesuturilor ce ar face piesa recoltată inutilizabilă;

✕ 2. *desicarea sub vid* - sublimarea apei ce are drept scop eliminarea apei, prezentă în mare parte sub formă de cristale de gheață conținute în interstițiile țesutului.

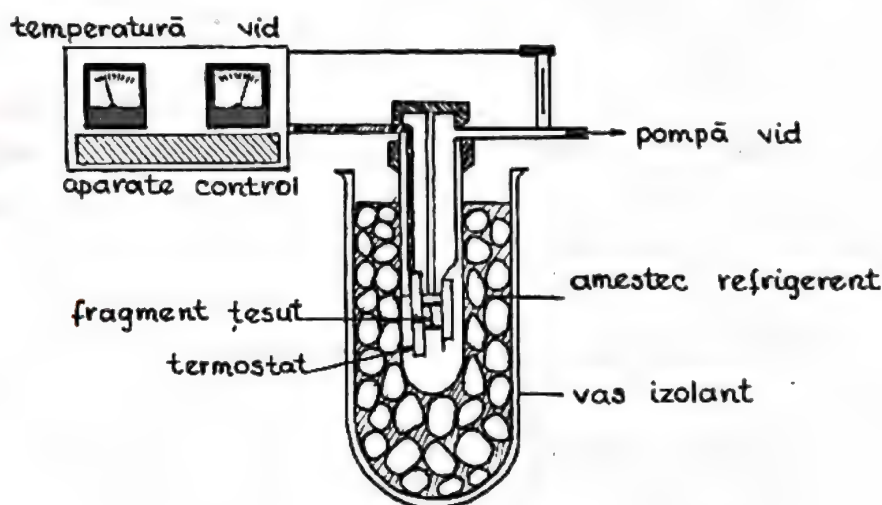


Fig.14. Schema aparatului de congelare-desicare

✕ 3. *tratamentul ulterior al piesei* - piesa odată deshidratată nu prezintă la examenul microscopic nici o retracție comparativ cu starea proaspătă, proteinele tisulare sunt seci, dar nu denaturate. Urmează apoi impregnarea și includerea în parafină.

2.1.2.1.4. Avantaje și inconveniente. Indicații și contraindicații

Avantajele teoretice ale criodesicării sunt evidente existând însă unele limite ale acestei metode și contraindicații. Este vorba înainte de toate de necesitatea folosirii unor piese foarte mici. Apoi, există riscul compromiterii structurilor datorită formării, în momentul congelării țesuturilor, a unor cristale de gheață de talie superioară limitei puterii de separare a microscopului fonic. O "reticulare" a țesuturilor face piesa aproape inutilizabilă și este imposibil de evitat dacă dimensiunile preparatului depășesc 2 mm și chiar în cazul în care dimensiunile corespund tuturor exigențelor, această reticulare este foarte dificil de evitat în multe cazuri.

Lison, în 1960, arată că anumite țesuturi (ficat, pancreas, tegument) sunt bine conservate prin această metodă, în timp ce altele (rinichi, intestin) se conservă satisfăcător; conservarea devine necorespunzătoare în cazul testicolului, țesutului nervos, măduvii osoase și ganglionilor limfatici. Deși din punct de vedere morfologic rezultatele criodesicării pot rivaliza uneori cu cele obținute folosind fixarea prin agenți chimici, exigențele sale materiale sunt mult prea mari, prețul său de cost mult mai ridicat decât cel al fixării pe cale chimică.

Fără a-i contesta avantajele, în prezent se consideră că această metodă de fixare trebuie rezervată numai unor cazuri bine definite, în afara cărora ea nu prezintă nici o superioritate raportată la alte procedee mult mai rapide, mai puțin minuțioase și mai ieftine.

2.1.2.1.5. Fixarea prin congelare - substituție

Imaginată de Simpson (1941) și utilizată de un mare număr de cercetători, acestui procedeu i s-a acordat o importanță mult mai mică decât criodesicării. Principiul său este apropiat de cel al criodesicării și avantajele sunt asemănătoare.

Primul timp al acestei metode este asemănător cu cel al criodesicării: piesele foarte mici sunt congelate cu aceleași precauții dar deshidratarea se bazează pe cu totul alt principiu. Țesuturile congelate sunt transferate în etanol, eter sau glicol, răcit la o temperatură cuprinsă între -20° și -50°. În aceste condiții se stabilește un echilibru între faza solidă reprezentată de gheață și o fază lichidă conținând apă și solvent organic în proporții variabile în funcție de temperatură. De ex. la -20° echilibrul se realizează pentru amestecuri apă-etanol conținând în jur de 30% apă. Când excesul de solvent este mare, toată apa poate fi astfel extrasă din piesă, difuzia moleculelor de

apă în excesul de solvent asigurând o **deshidratare progresivă**, fără ca apa țesuturilor să revină în starea lichidă. Din punct de vedere practic această metodă este mult mai simplă în raport cu criodesicarea.

Fără a oferi toate garanțiile teoretice ale criodesicării, metoda congelării-substituție permite obținerea unor preparate bune din punct de vedere morfologic.

2.1.2.2. Fixarea prin agenți chimici

Dintre toți fixatorii fizici trecuți în revistă numai căldura asigură o fixare în adevăratul sens al cuvântului, adică o denaturare a proteinelor tisulare încât în majoritatea cazurilor, se impune intervenția agenților chimici susceptibili a asigura această denaturare. Înțelegem astfel rolul esențial pe care îl joacă fixatorii și amestecurile fixatoare chimice.

Printre criteriile de clasificare a fixatorilor chimici se iau în considerație în primul rând acțiunile lor asupra proteinelor, deoarece **denaturarea proteinelor reprezintă piatra de temelie a fixării**. În afara denaturării proteinelor, fenomen ce merge în paralel cu o serie de modificări din care cea mai vizibilă este o schimbare a **caracterelor solubilității**, lanțurile care reprezintă proteinele de structură sunt depliate; apar **legături intermoleculare noi ce conferă ansamblului o anumită rigiditate**; o serie de grupări pot deveni active în timp ce altele care puteau reacționa înaintea denaturării sunt mascate acum. Cum de altfel a și fost remarcat, **denaturarea nu este un fenomen uniform**, totdeauna același; fixatori diferiți pot fi cauza unor denaturări diferite, ce vor modifica o anumită proprietate a proteinelor asupra cărora acționează.

În funcție de **tipul de acțiune** asupra **ovalbuminei** (**floculare**) sau (**coagulare**) se poate face o clasificare a agenților chimici fixatori în:

1. **coagulanți** (metanol, etanol, acetonă, acid nitric, acid clorhidric, trioxidul de crom, etc.)

2. **necoagulanți** (acid acetic, tetraoxid de osmiu, bicromat de potasiu, formaldehida).

Deasemenea, trebuie avute în vedere acțiunile agenților chimici fixatori și asupra glucidelor și lipidelor tisulare, gradul de penetrare în interiorul pieselor, rețracția țesuturilor sub acțiunea lor, modificările morfologice ale organelor, etc. Numărul fixatorilor chimici simpli este relativ mic în comparație cu varietatea amestecurilor fixatoare. Vom trece în revistă în continuare câțiva dintre fixatorii simpli și amestecurile fixatoare cel mai frecvent utilizate.

2.1.2.2.1. Fixatori simpli

a. Etanolul - lichid incolor, ușor miscibil cu apa, uneori utilizat ca fixator la concentrații variind între 70% - 100%. Este utilizat în special în scopul fixării glicogenului și conservării elementelor minerale insolubile în alcool; în marea majoritatea a cazurilor este folosit în amestecuri (alcool-formol, amestecul Carnoy etc). Utilizat singur este un fixator mediocru prezentând o serie de inconveniente (ex.retracția țesuturilor după un anumit timp de acțiune).

b. Formaldehida - este un gaz ce este utilizat sub formă de soluție în apă cu o concentrație de 36%-40% fiind în mod obișnuit numită **formol**.

Soluțiile formaldehidei constituie fixatorii cei mai folosiți, fiind utilizați frecvent singuri și nu în amestecuri. Aceste soluții trebuie însă neutralizate adăugând carbonat de calciu sau de sodiu sau tamponate până la neutralitate.

În caz contrar, se formează progresiv acid formic prin oxidare, ceea ce reprezintă un inconvenient important pentru fixare. Formolul face parte totodată din numeroase amestecuri fixatoare.

c) Acizii organici și minerali - nu sunt utilizați singuri ci ca adjuvanți în amestecurile fixatoare. Ex: 1) acidul acetic, unul din cei mai vechi fixatori cunoscuți, este utilizat în diferite amestecuri: Bouin, Hollande, Carnory, etc; este un bun fixator al nucleului.

2) acidul tricloracetic - în soluții apoase de 5-10% are proprietăți asemănătoare, prezentând și o capacitate decalcifiantă; intră în alcătuirea amestecului Bouin tricloracetic și a fixatorului Heidenhain denumit "Susa".

3) acidul picric - este un excelent fixator al proteinelor și adăugarea lui în soluțiile fixatoare favorizează anumite colorații cum ar fi cele ale colagenului sau cele folosite pentru studiul glandelor endocrine.

4) acidul cromic - în soluție apoasă 1% este utilizat exclusiv ca djuvant în anumite amestecuri ex: Flemming, Benda, etc.

d) Tetraoxidul de osmiu - este cel mai bun fixator citologic cunoscut, rămânând încă fixatorul de bază pentru studiile de microscopie electronică, deoarece păstrează cel mai bine structurile tisulare și relațiile dintre acestea. Prezintă dezavantajul de a fi puțin penetrant și de a face țesuturile foarte friabile, făcând dificilă confecționarea secțiunilor. Pentru aceste motive și datorită prețului ridicat și toxicității sale (conjunctivite), este puțin utilizat ca fixator în microscopia fonică.

Este folosit doar pentru conservarea mitrocondriilor sau a aparatului

Golgi sau în stare de vapori pentru fixarea fronturilor. Alte substanțe folosite ca fixatori chimici simpli sau intrând în compoziția unor amestecuri fixatoare sunt: sărurile de metale grele (bicromat de potasiu) clorura mercurică, acetonă, dioxanul etc.

2.1.2.2.2. Amestecuri fixatoare

Sunt amestecuri de doi sau mai mulți fixatori simpli la care se pot adăuga substanțe destinate realizării unui anumit pH al soluției.

Principalele amestecuri fixatoare utilizate în biologia celulară se pot sistematiza în patru grupe:

✕ 1. *Amestecuri cromo-osmice* (Flemming, Benda, Champy, Benoit Nassonov) conservă foarte bine structurile nucleare, centriolii, aparatul fusorial, diferențieri ale plasmalemei ca marginea în perie, platoul striat și cilii. Retricțiile sunt mici și piesele se pot include în parafină. Timpul optim de fixare este de 12-24 ore.

✕ 2. *Amestecurile cromice fără OsO_4 și acid acetic* (Orth, Kopsch, Regaud, Helly, Maximov) sunt utilizate pentru studiul mitocondriilor și permit impregnarea argentică a complexului Golgi; conservă granulele de secreție iar gama de colorații și reacții citochimice după aceste fixări este foarte largă.

✕ 3. *Amestecuri de bază de metale grele în afară de crom și OsO_4* (Ramon y Cajal, Da Fano, Aoyama) conservă mitocondriile și permit impregnarea argentică a complexului Golgi. Timp optim de fixare 3-25 ore.

✕ 4. *Amestecurile cromo-acetice* (Telliensniczky, Zenker, Kolmer, Sanfelice) se folosesc în studiul granulelor de secreție, a ergastoplasmei, cililor precum și în cariologie. Timp optim de fixare 12-24 ore.

Alți fixatori: În afara celor patru grupe descrise mai sus, se pot utiliza cu rezultate asemănătoare și alți fixatori.

✕ 1. *Amestecul formol-calciu* (Baker) reprezintă un excelent fixator pentru mitocondrii și complexul Golgi.

✕ 2. *Fixatorii Clarke și Carnoy* conservă foarte bine reticulul endoplasmatic granular.

✕ 3. *Fixatorii Bouin, Susa, Heidenhein* sunt utilizați în studiul produșilor de secreție iar amestecurile pe bază de sublimat și formol sau acid acetic pot servi pentru conservarea centrosomului, aparatului fusorial și cililor.

2.1.2.3. Practica fixării

Arta fixării constă în utilizarea corectă a fixatorului ce corespunde fiecărui caz în parte, adică de a ști ce fixator trebuie folosit în funcție de obiectivele lucrării, cunoscut fiind faptul că nu există un fixator universal. Un fixator simplu e greu să întrunească toate calitățile necesare unei bune fixări, motiv pentru care se recurge la amestecuri fixatoare în care diverși constituenți își completează reciproc acțiunea. La alegerea fixatorului se ține cont de:

- ✓ - natura țesutului sau organului;
- ✓ - detaliile de structură care trebuie evidențiate;
- ✓ - colorația pe care o vrem să o facem.

2.1.2.3.1. Reguli generale ale fixării

a. Evitarea alterărilor autolitice - fixarea trebuie făcută cât mai repede posibil după recoltarea materialului biologic

b. Spălarea fragmentelor - într-o soluție fiziologică și nu în apă care poate provoca umflarea țesuturilor.

c. Evitarea uscării țesuturilor - făcând toate manavrele ce preced fixarea într-un mediu umed (ex. acoperind fragmentele cu o soluție fiziologică umectând lamele de ras și celelalte instrumente cu aceeași soluție)

d. Tăierea unor fragmente suficient de mici

e. Facilitarea la maximum a penetrării fixatorului - în organe și țesuturi; pentru aceasta se vor utiliza flacoane mari cu fundul plat și dop rotat; nu se va lăsa sânge sau mucus la suprafața piesei; se evită ca acestea să se lipească de pereții recipientului în care se face fixarea, agitând din timp în timp flaconul.

f. Utilizarea unui volum suficient de fixator

În afara unor cazuri particulare, volumul fixatorului trebuie să fie de aproximativ 40-50 ori mai mare decât a fragmentului fixat.

g. Piese se introduc în amestecul fixator **ambalate în tifon** și purtând un număr de ordine pentru identificare.

h. Durata fixării variază în funcție de compoziția amestecului fixator, structura și dimensiunea pieselor, temperatură - existând o durată optimă pentru fiecare fixare.

i. Un fixator utilizat odată nu poate fi folosit pentru fixarea altei piese

Nici un fixator citologic nu este universal și de aceea arta fixării constă în alegerea corectă a amestecului în raport de ceea ce trebuie studiat.

	ORGANIT	FIXATORI UTILIZATI
1.	Nucleul	Clarke, Carnoy, Bouin + CrO_3
2.	Cromatină sexuală	Amestecuri cromo-osmice
3.	Nucleolul	Sanfelice și fixatori pe bază de CrO_3
4.	Complex Golgi	Champy, Nassonov, R.Y.Cajal, Da Fano
5.	Mitochondrii	Orth, Kopsch, Regaud, Altman, Benoît
6.	R.E.G.	Bouin, Susa, Heidenhaim, Clarke, Carnoy
7.	Tonofibrile	Carnoy
8.	Microvili	Carnoy, Flemming, Benda, Campy, Benoît
9.	Cili	Sanfelice, Kolmer, Champy, Benda
10.	Granule de secreție	Bouin, Zenker, Susa, Clarke, Caroy

2.1.2.3.2. Compoziția chimică a fixatorilor citologici

A. Amestecuri cromo-osmice

1. Fixatorul Fleimming

- tetraoxid de osmiu 2% 4 ml
- trioxid de crom 1% 15 ml
- acid acetic 1 ml

2. Fixatorul Benda

- tetraoxid de osmiu 2% 4ml
- trioxid de crom 1% 15 ml
- acid acetic 3 pic.

3. Fixatorul Altman

- tetraoxid de osmiu 2% 10 ml
- biocromat de K 5% 10 ml

4. Fixatorul Champy

- tetraoxid de osmiu 2% 4 ml
- trioxid de crom 1% 7 ml
- biocromat de K 7 ml

5. Fixatorul Benoît

- tetraoxid de osmiu 2% 5 ml
- biocromat de K 5% 6 ml
- clorură mercuriană 5% 5 ml

- nitrat de uranil 4% 4 ml

B. Amestecuri cromice

1. *Fixatorul Kopsch*

- biocromat de K 3,5% 4 ml

- formol 40% 1 ml

2. *Fixatorul Orth*

- lichid Müller 9 ml

apă distilată 100 ml

biocromat de K 2,5g

sulfat de Na 1g

- formol 40% 1 ml

3. *Fixatorul Regaud*

- biocromat de K 3% 4 ml

- formol 40% 1 ml

4. *Fixatorul Helly*

- lichid Zenker 9,5 ml

clorură mercurică 5g

apă distilată 100 ml

- formol 40% 0,5 ml

C. Amestecuri pe bază de metale grele în afară de Os și Cr

1. *Fixatorul R. Y. Cajal*

- nitrat de uranil 2% 85 ml

- formol 40% 15 ml

2. *Fixatorul Da Fano*

- nitrat de cobalt 1% 85 ml

- formol 40% 15 ml

D. Alți fixatori

1. *Fixatorul Bouin*

- soluție apoasă saturată de acid picric 75 ml

- acid acetic cristalizat 5 ml

- formol 40% 25 ml

2. *Fixatorul Carnoy*

- alcool etilic 100% 60 ml

- cloroform 30 ml

- acid acetic 10 ml

Piese se trec direct în alcool etilic 100%

2.1.3. Includerea în parafină

Introdusă în tehnica histologică de Krebs încă din 1869, includerea în parafină reprezintă și astăzi cea mai utilizată din toate tehnicile de includere (celoidină, unele mase plastice, gelatina).

Produsul cunoscut sub numele de parafină este un amestec de hidrocarburi alifaticе prezentând o serie de caractere fizice de care depind calitatea includerii și a secțiunilor: gradul de fisurare ce indică prezența între cristale a aerului și impurităților lichide, duritatea, plasticitatea și vâscozitatea. Din punct de vedere chimic parafina nu este miscibilă nici cu apa nici cu alcoolurile: metilic, etilic și propilic, nici cu glicerina; este miscibilă cu eterul sulfuric, anilina, dioxanul, sulfura de carbon, hidrocarburile benzenice, etc.

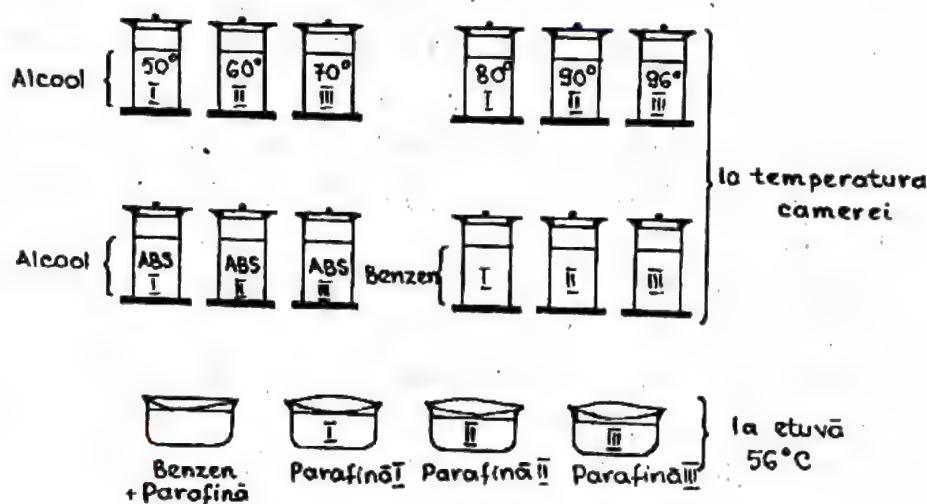


Fig.15. Bateria de includere la parafină

Includerea la parafină este condiționată de aceste caractere de solubilitate și o penetrare perfectă a pieselor necesită în primul rând deshidratarea lor și apoi impregnarea cu un lichid miscibil cu parafina; numai piesele tratate prin criodesicare pot fi impregnate bine cu parafina fără nici o baie complementară. Utilizarea cu succes a parafinei în citologie se datorează tocmai proprietăților sale:

1. solubilitatea în agenți clarifianți și topirea la temperaturi apropiate de 55° ce permite impregnarea țesuturilor fără ca acestea să sufere alterări structurale importante.

2. ea redevine solidă, fără a fi de o duritate excesivă la temperatură

obișnuită, fapt ce permite confecționarea de "blocuri" în care fragmentul tisular inclus, este perfect menținut și va putea fi secționat la grosimi foarte mici.

Includerea la parafină a țesuturilor fixate prin una din metodele descrise anterior se realizează parcurgând următoarele etape principale: deshidratarea, clarificarea, impregnarea cu un solvent al parafinei, impregnarea cu parafină urmată de inclusiunea propriu-zisă.

X 2.1.3.1. Deshidratarea

Deoarece parafina nu este solubilă în apă nu se pot include țesuturile fixate ce conțin multă apă, fără o prealabilă deshidratare. Aceasta se face cu un agent chimic anhidru capabil să absoarbă apa din țesuturi în condițiile în care acestea nu modifică structurile celulare. În practică, cel mai des utilizat este alcoolul absolut; uneori se folosește însă diaxonul sau acetona.

Uzual, această operație se realizează trecând țesuturile fixate prin alcooluri de concentrație crescătoare, ex: alcool 60°, 70°, 80°, 95°, 100°, deoarece unii autori consideră că acțiunea brutală a alcoolului absolut antrenează o retracție a țesuturilor. Totuși, când piesele au fost fixate cu ajutorul unui lichid pe bază de alcool, chiar și cei mai prudenți citologi admit începerea deshidratării la un grad alcoolmetric superior fixatorului (96° sau chiar alcool absolut-Carnoy).

Pentru țesuturile fragile se recomandă o deshidratare lentă începând cu alcool 50° iar pentru celelalte se începe cu alcool 70°. Volumul alcoolului din baia de deshidratare trebuie să fie de aproximativ 10 ori mai mare decât volumul piesei.

Este preferabilă utilizarea mai multor băi de scurtă durată decât o singură baie abundentă și prelungită.

Durata deshidratării este în funcție de volumul fragmentelor tisulare. Pentru cele de talie mijlocie deshidratarea se efectuează în 2-3 ore.

Deshidratarea trebuie să se încheie întotdeauna, în cazul în care se face în etanol, cu o baie de alcool absolut nou, ce nu a fost folosit.

X 2.1.3.2. Clarificarea

Se face după deshidratare, piesa fiind trecută prin băi succesive de solvent organic. Acesta poate fi: toluen, xilen, benzen, cloroform.

Clarificarea se face în general în 3 băi de 1-6 ore pentru piesele mijlocii și de 15-30 min. pentru un fragment biopsic sau o piesă foarte mică.

2.1.3.3. Impregnarea cu parafină

Se face în parafină menținută în stare lichidă, prin plasarea ei într-un termostat la 56° . Se adaugă la parafină o mică cantitate (5-10%) de ceară de albine care îmbunătățește consistența blocului și va permite o bună secționare. Calitatea secțiunilor depinde în mare parte și de absența oricărei urme de solvent în parafină; aceasta se obține prin trecerea pieselor prin cel puțin 3 băi succesive de parafină înaintea turnării blocului. Durata impregnării variază în funcție de volumul piesei, fiind în medie de 6 ore.

Unii autori au imaginat sisteme de impregnare sub vid, camera termostatului fiind bransată la o pompă de vid. Acest procedeu permite o impregnare mai rapidă și este, în special, foarte bună pentru impregnarea țesuturilor aerate, cum ar fi fragmentele pulmonare.

2.1.3.4. Includerea propriu-zisă

După ieșirea din ultima baie de parafină, piesa se așează în parafină nouă, neutilizată, care se toarnă într-o formă, în general alcătuită din bare metalice-barele Leuckhardt - (se pot utiliza și bare realizate din carton, aluminiu sau plastic).

Răcirea acestei parafine duce la solidificarea ei și obținerea unui bloc gata de a fi secționat. Răcirea este în general obținută lăsând parafina la temperatura laboratorului.

Pentru identificarea diferitelor piese dintr-un bloc ne servim în continuare de aceleași cartonașe cu numere de ordine care le-au însoțit pe parcursul prelucrării lor, inclusiv în băile de parafină.

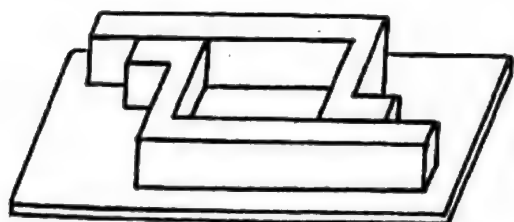


Fig.16. Barele Leuckart

Parafina este mediul de includere cel mai frecvent utilizat dar, există și alte medii și tehnici de includere: în paraplast, în celoidină, dublă includere în celoidină și parafină, în dietilen sau polietilen glicol sau în gelatină, unele dintre ele fiind introduse destul de recent în practica citologică și vor căpăta probabil o mare dezvoltare în viitor.

1. Includerea în paraplast

Paraplastul este un amestec de parafină purificată și polimeri plastici care prezintă o mare rezistență și elasticitate. Includerea pieselor în acest amestec permite confecționarea de secțiuni deosebit de fine de țesuturi dure sau de consistență diferită cu rezultate foarte bune; în acest domeniu, această metodă tinde să înlocuiască tot mai mult procedeele clasice de includere în celoidină sau de dublă includere. Anumite laboartoare utilizează în mod curent paraplastul în locul parafinei. Tehnica de includere este aceeași ca și în cazul includerii în parafină.

2. Includerea în celoidină

Celoidina, utilizată în soluție cu un amestec de eter și etanol, este un mediu de includere care are avantajul de a realiza impregnarea țesuturilor la rece. Ea este o formă purificată de nitroceluloză.

Includerea pieselor este foarte simplă: după fixare ele sunt deshidratate apoi impregnate cu soluții de celoidină în concentrație crescătoare, la temperatura laboratorului; când este gata impregnarea se lasă să se întărească ultima soluție prin evaporarea solventului și blocul astfel obținut este gata pentru secționat. Acest procedeu de includere prezintă față de includerea în parafină avantaje și dezavantaje.

Dintre avantaje amintim faptul că:

- tehnica este simplă și principiul său nu necesită încălzirea;
- mediul de includere conservă bine structurile și raporturile între țesuturi de consistență diferită;
- consistența sa fermă și elastică este un excelent suport pentru țesuturile dure;

Aceste proprietăți fac din celoidină mediul de includere ideal pentru organele formate din țesuturi de consistență diferită, pentru formațiuni chistice, țesuturi fibroase sau musculare din care este adesea dificil de obținut secțiuni regulate și omogene după includerea în parafină.

Consistența sa permite secțiuni de dimensiuni mai mari; acest procedeu este folosit pentru includerea organelor cum ar fi: uterul, glanda mamară, etc. și mai ales encefalul, includerea în celoidină reprezentând metoda de bază în tehnica neurologică.

Dintre inconveniente amintim:

- metoda este lentă și unele etape mai dificile;
- mediul de includere nu permite confecționarea unor secțiuni foarte fine (sub 10 microni);
- blocurile nu pot fi conservate ca atare: este necesară păstrarea lor

în etanol 70% sau 80%.

3. Dubla includere în celoidină și parafină

Această metodă combină unele dintre avantajele metodei includerii în celoidină cu cele ale includerii în parafină (rapiditate, obținerea de secțiuni fine, etc.)

Există mai multe moduri de realizare a acestei metode, cele mai simple constând în: deshidratarea și impregnarea în soluții de celoidină în concentrație crescătoare și apoi printr-o soluție (ex: benzen) de clarificare, luând impregnarea piesei cu parafină ca în procedeul uzual al includerii în parafină.

4. Includerea în dietilen și polietilen glicol

a. Dietilen glicolul "Ester Waxes" - mediu mult mai dur decât parafina, prezintă unele avantaje față de parafină și celoidină; blocurile rezultate sunt mai dure decât cele de parafină și este necesară utilizarea unui cuțit foarte rezistent și a unui microtom foarte stabil.

b. Polietilen glicolii "Poliester Waxes" - sunt medii de includere care prezintă un mare interes teoretic pentru faptul că sunt hidrosolubili, nefiind necesară deshidratarea pieselor și folosirea unui agent clarifiant, în felul acesta economisindu-se timp (o includere se poate face în 4-5 ore) și realizându-se o diminuare a retracției țesuturilor.

Piese ne fiind trecute prin alcoolii sau solvenți organici, lipidele sunt conservate în secțiunile care sunt mai fine și mai regulate decât cele obținute prin congelare.

Din păcate, în ciuda optimismului numeroșilor cercetători, secțiunile sunt destul de dificil de realizat și de etalat pe lamă din cauza higroscopiei polietilen glicolului. Astfel, această metodă de includere este folosită doar pentru anumite cercetări cum ar fi studiul lipidelor sau punerea în evidență a lipidelor și a mucopolizaharidelor.

5. Includerea în gelatină - este utilizată în cazul unor țesuturi fragile sau de volum mic.

Fragmentele fixate sunt trecute prin soluții de gelatină de concentrație crescătoare, așezate apoi în gelatină turnată într-o formă, blocul de gelatină se solidifică și este gata de a fi secționat.

Procedeul prezintă un inconvenient: gelatina solidificată prin acțiunea formolului nu poate fi prea mult îndepărtată ceea ce crează dezavantaje la colorarea secțiunilor.

6. Incluserile automate

Intreprinderi specializate furnizează de câțva ani aparate ce permit trecerea automată a pieselor prin diferiți agenți chimici utilizați pentru includere. Aceste aparate au cunoscut un mare succes și echipează în prezent multe laboratoare.

Ele prezintă un avantaj: economisirea timpului deoarece aparatele funcționează continuu, zi și noapte și sunt înzestrate cu sisteme de agitare a pieselor în diferiți solvenți, ceea ce crește viteza de impregnare.

Dau rezultate bune când sunt folosite la includerea fragmentelor de volum asemănător, timpii de trecere a pieselor prin diferite băi fiind în funcție de acest volum.

2.1.4. Secționarea

Confecționarea secțiunilor pare la prima vedere cea mai simplă manoperă din cadrul celor care duc în final la realizarea unui preparat citologic.

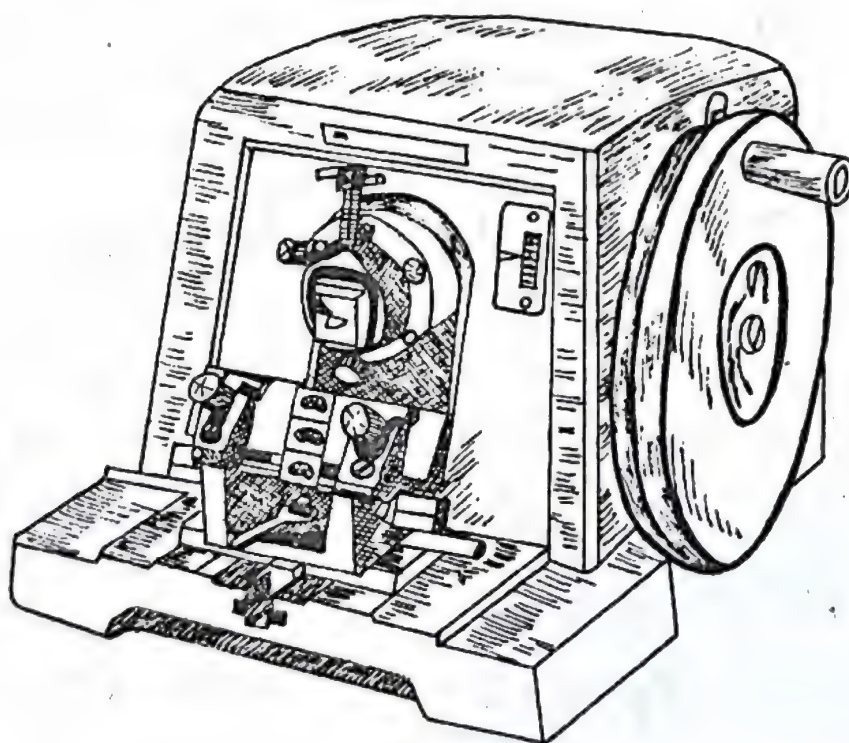


Fig.17. Microtomul de parafină Spencer 820

Realitatea este însă cu totul alta. Obținerea unor secțiuni bune nu este un lucru chiar atât de ușor, fiind posibilă numai după o experiență

îndelungată. Modul în care sunt realizate secțiunile, influențează calitățile optice ale preparatelor finale la fel de mult ca și fixarea.

Secționarea se realizează cu ajutorul microtoamelor, existând două tipuri.

× 1. Microtoame cu mișcare verticală, piesa deplasându-se de sus în jos, secționarea fiind realizată de un cuțit cu tăișul înalt (ex: microtomul rotativ Spencer 820, Minot etc.)

× 2. Microtoame cu mișcare orizontală: în acest caz piesa poate fi menținută fix, cuțitul deplasându-se orizontal, sau invers cuțit fix și piesa în mișcare.

Primul tip de microtom este cel mai utilizat, fiind folosit pentru secționarea blocurilor de parafină.

Al doilea tip este folosit mai ales pentru blocurile de celoidină, pentru cele care au suferit o dublă includere sau pentru blocurile mari de parafină.

Piesele esențiale ale unui microtom tip rotativ sunt: cuțitul, suportul cuțitului care-l menține în poziție și permite orientarea lui, port-obiectul și dispozitivul lui de fixare, șurubul micrometric cu ajutorul căruia se fixează grosimea secțiunii, dispozitivul pentru avansarea piesei și roata motrice.

Înainte de secționarea propriu-zisă, blocul de parafină ce conține preparatul se va modela în formă de trunchi de piramidă patru unghiulară astfel încât în jurul piesei să rămână o bandă de parafină de 1-2 mm grosime. Astfel finisat el se fixează, indiferent de mediul de includere folosit, cu baza mare pe un port-obiect care se montează la microtom.

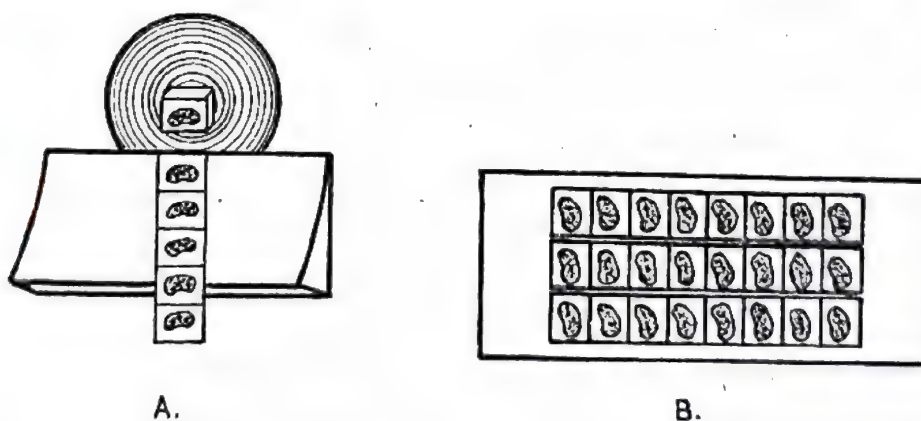


Fig.18. Banda de secțiuni seriate. a-secțiunile la parafină; b-etilate pe lama port-obiect

Pentru blocurile de parafină această operație este foarte simplă: se

încălzește port-obiectul metalic apoi se aplică blocul de parafină, se introduc poi în apă rece, menținând în contact cele două piese până când blocul aderă solid la port-obiect.

Montarea blocurilor de paraplast, Ester Wax, sau a celor obținute prin dublă includere se realizează la fel ca și în cazul blocului de parafină.

Blocurile de celoidină și Necol sunt montate pe port-obiecte din lemn sau plastic pe care se pune un strat dintr-o soluție de celoidină 2% în alcool-eter; blocul este menținut apoi apăsător pe portobiect timp de o oră și ansamblul este apoi introdus în alcool 70% timp de o jumătate de oră, înainte de a fi fixat la microtom.

2.1.5. Etalarea și lipirea secțiunilor pe lamă

În vederea prelucrării lor ulterioare (colorare), secțiunile trebuie aplicate pe un port-obiect (lamă de sticlă cu dimensiunile de 76/26 mm și grosimea de 1-1,5 mm) bine degresat.

Metodele de etalare și lipire variază în funcție de procedeul de includere ce a fost folosit:

1. *Pentru secțiunile la parafină*, paraplast sau Ester Wax: panglicile de parafină obținute prin procedeul secționării la microtom sunt plisate și trebuie etalate pe un mediu lichid, slab încălzit, pentru ca pliurile să dispară. Pentru aceasta se pot utiliza două procedee:

a. Etalarea la bain-marie:

În această tehnică, numită de flotare ("floating technics"), panglicile de parafină conținând una sau mai multe secțiuni, sunt puse la suprafața apei la bain-marie la aprox. 40°. Sub influența căldurii parafina se înmoaie și pliurile dispar. Panglicile nu trebuie încălzite prea mult pentru a se împiedica topirea parafinei ceea ce ar duce la disocierea secțiunii.

Când pliurile au dispărut, secțiunile se trec pe o lamă de sticlă pe care s-a aplicat în prealabil o peliculă subțire de gelatină.

b. Etalarea pe lamă - este procedeul cel mai frecvent utilizat.

O lamă de sticlă este acoperită cu o picătură de soluție apoasă de gelatină (0,1-0,2%) sau albumină Mayer (50g albuș de ou, 50g glicerină și 1g salacilat de sodiu dizolvat în puțină apă distilată, amestec care se va filtra sub un clopot) - cel mai des utilizat sau soluție de amidon sau amilopectină, plasmă umană sau soluții agar care se întind bine cu ajutorul pulpei auricularului. Din panglica de parafină se taie fragmente conținând 3-4

secțiuni care se aplică (cu fața lucioasă în jos) pe suprafața unsă cu albumină Mayer a lamei; se picură apă distilată la una din extremitățile panglicii de parafină și înclinăm puțin lama pentru ca secțiunile să plutească; o așezăm orizontal pe o placă încălzitoare reglată la o temperatură inferioară celei a punctului de topire al parafinei folosită pentru includere.

În câteva secunde secțiunile se descreșesc și se întind complet (la nevoie pentru întinderea completă a secțiunilor se pot folosi două ace de disociere).

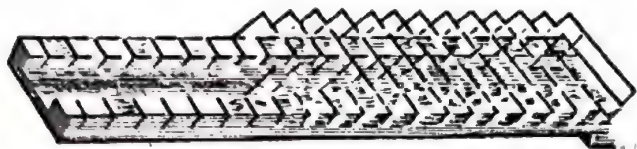


Fig.19. Suportul pentru uscarea preparatelor

După întinderea completă, apa în exces se îndepărtează iar lamele puse înclinat pe un stativ de lemn se introduc într-un termostat la 37°C unde, timp de 24 ore se desăvârșește uscarea și lipirea secțiunilor. Ferite de praf, aceste preparate pot fi conservate necolorate timp îndelungat.

2. *Pentru secțiunile în celoidină* - pot fi utilizate trei modalități de etalare și lipire:

a. Transportul secțiunilor culese în etanol 70%, în diferiți reactivi sau coloranți: pelicula de celoidină menține textura secțiunii astfel încât aceasta nu suferă alterări în cursul manoperelor; secțiunea va fi apoi montată pe o lamă fără eliminarea peliculei de celoidină.

b. Se poate deasemenea lipi secțiunea pe o lamă de sticlă cu ajutorul unei soluții de celoidină; procedeul nu poate fi aplicat decât în cazul când colorațiile ulterioare nu colorează celoidină care nu este eliminată înaintea montării.

c. Când coloranții folosiți se fixează pe celoidină secțiunile trebuie lipite cu ajutorul unei soluții de gelatină.

3. *Secțiunile în celoidină-parafină* sunt în general etalate și lipite ca și secțiunile la parafină.

4. *Secțiunile în polietilen-glicol*

Secțiunile vor fi etalate folosind o soluție de gelatină sau albumină, dar la rece. Etalarea corectă este adesea dificil de obținut datorită higroscopiei polietilen-glicolilor folosiți, dar utilizarea mediului Reid și Sarantakos îndepărtează acest inconvenient.

2.2. METODA SECȚIONĂRII LA GHEAȚĂ ȘI CRIOTOM

Cu ajutorul microtomului de congelare și a criotomului se pot obține preparate permanente sau temporare făcându-se secțiuni de țesut proaspăt nefixat sau secțiuni de țesut fixat.

A. *Secțiuni de țesut proaspăt, nefixat se fac în următoarele situații:*

1. când se cere un diagnostic anotomo-patologic urgent (examen extemporaneu, timp de execuție 15-30 min); de acest diagnostic depinde tehnica operatorie;

2. detectarea histochimică a unor substanțe (grăsimi) care sunt solubile în hidrocarburile benzenice utilizate în tehnica includerii la parafină.

3. în unele cercetări histoenzimologice.

B. *Secțiunile de țesut fixat* au indicații numeroase dintre care mai importante sunt:

1. examenul extemporaneu făcut pe fragmente de țesut sau organ introduse rapid în formol cald; procedeul este brutal dar oferă rezultate mulțumitoare.

2. unele studii histochimice (catecolamine, vitamina D, etc.).

3. cercetări neurohistologice (metoda Benda-Spielmayer pentru mie-lină, Bielschowsky - Gross pentru terminații nervoase).

ATENȚIE: Secțiunile din piesele fixate în fixatori apoși trebuie bine spălate iar cele din fixatorii anhidri, hidrate.

2.2.1. Tehnica secționării la microtomul de congelare

Microtromul de congelare funcționează pe același principiu general ca și cel de parafină cu deosebirea că portobiectul este fix iar cuțitul este mobil; deasemenea, portobiectul prevăzut cu orificii la bază, este racordat printr-o conductă capilară la o butelie metalică în care se găsește anhidridă carbonică lichidă sub presiune (fig.20).

Pe portobiectul microtromului se aplică o rondelă de hârtie de filtru îmbibată cu apă.

Piesele fasonate din țesutul sau organul proaspăt, nefixat sau fixat, se așează pe runde de hârtie de filtru umezită. Se vor confecționa piese cu o grosime de 0,5-0,8 cm cu fețele plane și paralele.

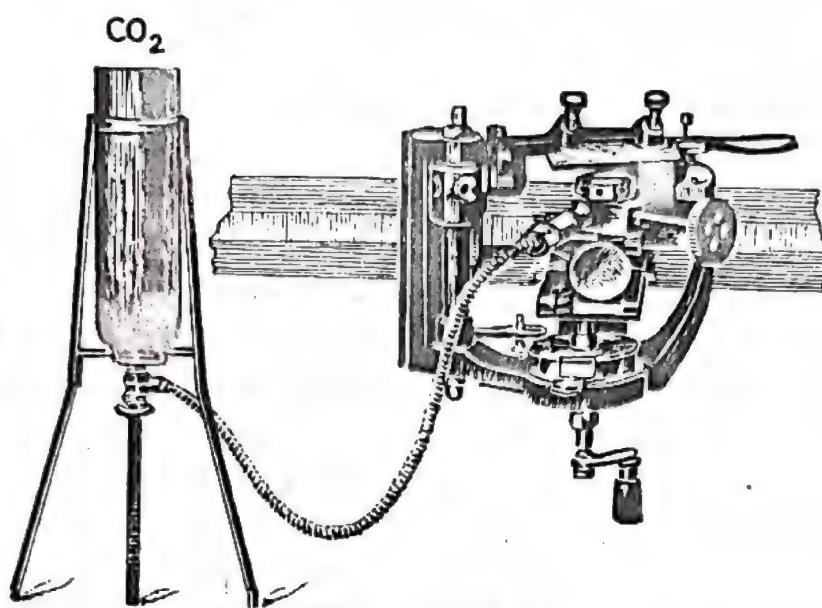


Fig.20. Microtromul pentru secționarea pieselor congelate (model Leitz).

Se acoperă piesa și portobiectul cu un pahar de sticlă sau plastic transparent, se deschide cu intermitență robinetul buteliei și prin detenta vaporilor de anhidră carbonică se produce înghețarea și aderarea piesei de portobiect.

Prin intermediul șurubului micrometric se ridică portobiectul până când piesa ajunge aproape de cuțitul microtromului care are o poziție orizontală. După fixarea grosimii, prin mișcări rapide și complete ale suportului cu cuțit, se obțin secțiuni de 10-15 microni; acestea se culeg cu pulpa degetului sau cu o pensulă umedă printr-o mișcare de la bază spre tăișul cuțitului și se pun într-un cristalizator cu apă distilată unde se dezgheață și se întind.

Lipirea secțiunilor. Lamele/portobiect după ce au fost acoperite cu un strat subțire de albumină Mayer se lasă să se usuce 15-30 min la temperatura camerei. Se introduc apoi oblic în vasul cu apă distilată și cu ajutorul unei baghete de sticlă în formă de *L* secțiunile se pescuiesc pe lame.

Se elimină excesul de apă prin presare ușoară cu o hârtie de filtru și se colorează rapid.

DE REȚINUT - La ora actuală tehnica secționării la gheață se folosește doar pentru lucrări de rutină. Pentru cercetările citologice de finețe

se utilizează tehnicile de secționare la criotom, criodesicare (congelare-deshidratare) și congelare disoluție (congelare substituție).

2.2.2. *Tehnica secționării la criotom*

Această metodă se deosebește de precedenta doar prin faptul că la acest apart secționarea nu este influențată de temperatura mediului ambiant iar cuțitul și piesa sunt meținute la o temperatură constantă de -12°C -30°C .

Aparatul este compus dintr-un microtrom asemănător cu cel de parafină amplasat într-o incintă izotermă răcită prin intermediul unui agregat frigorific cu freon.

Tehnica de lucru

Fragmentul de țesut sau de organ nefixat așezat pe o rondea de hârtă de filtru bine umezită este plasat pe portobiectul criotomului.

- portobiectul cu piesa așezată vertical pe un suport metalic, sunt introduse într-un recipient special care conține un lichid refrigerent (azot lichid-temperatura -196°C);

- introducerea portobiectului cu piesa congelată în suportul criotomului aflat în camera izotermă și secționarea la grosimi de 5-10 microni;

- secțiunile care rămân întinse pe cuțit se aplică pe lame portobiect prin simplu contact.

Indicațiile criotomieii

- cercetări de citochimie
- studii de citoenzimologie
- cercetări de imunofluorescență.

2.2.3. *Metoda criodesicării (congelare-deshidratare)*

Principiul acestei metode precum și timpii ei au fost descriși la capitolul II. Metoda este folosită în studiul citologic de finețe și citoenzimologic. În histochimie, metoda este utilizată numai în studiul catecolaminelor.

2.2.4. Metoda de congelare-substituție

Principiul acestei tehnici este apropiat de cel al metodei de congelare-deshidratare; conservarea substanțelor din celule este bună.

Tehnica de lucru

- Congelarea bruscă a unui fragment de țesut sau organ proaspăt în azot lichid;
- Substituția gheții prin transferul piesei congelate în alcool etilic absolut la temperaturi joase (-40°C - 70°C) timp de aproximativ 7 zile;
- Piesa împreună cu alcoolul în care s-a făcut substituția va fi adusă la temperatura camerei;
- Includerea la parafină;
- Secționarea;
- Colorarea

Indicații

Prin această metodă se conservă foarte bine structurile citologice și numeroși componenți chimici. Substituția în acetonă a permis evidențierea a numeroase activități enzimatice ca: fosfataza alcalină și acidă, succindehidrogenaza, adenozintrifosfataza etc.

Se conservă foarte bine acizii nucleici și glicogenul.

2.2.5. Tehnica colorării secțiunilor obținute la microtromul de congelare

Colorarea secțiunilor la congelare se poate face fie pe secțiuni libere fie pe secțiuni lipite pe lame portobiect.

În primul caz, bateria de colorare este formată din cutii Petri cu diametru mic prin care secțiunile se trec cu ajutorul unor baghete de sticlă în formă de "L". După colorare, aceste secțiuni se pescuiesc pe lame portobiect și se montează în medii apoase.

În al doilea caz, secțiunile se colorează la fel ca cele la parafină.

Colorarea secțiunilor lipite pe lame cu soluția 1% de albastru tuluiidină are următorii timpi:

- trecerea secțiunilor prin alcool etilic 90%, 1-2 secunde și apoi în

alcool etilic 100% timp 1-2 secunde;

- introducerea lor într-o baie de xilol timp de aproximativ 2 secunde;
- îndepărtarea xilolului prin alcool etilic 100%, 1-2 secunde și alcool

etilic 90%, 1-2 secunde;

- lamele cu secțiunea în sus se așează pe un suport orizontal și se acoperă cu soluția de albastru de toluidină 30-60 secunde;

- spălarea rapidă în apă distilată-sugativare;

- deshidratare rapidă în alcool etilic 90% - sugativare, apoi în alcool etilic 100% - sugativare;

- clarificare în xilol, montare în balsam de Canada.

Rezultate

Nucleii apar în albastru închis iar citoplasma în albastru deschis.

2.3. METODA ETALĂRII MATERIALULUI BIOLOGIC ÎN MONOSTRAT

Acestă metodă cuprinde tehnica frotiului și amprentelor de organe. Prin tehnica frotiului, se realizează întinderea celulelor în monostrat pe lame de sticlă, putând fi examinate celulele sanguine (periferice și medulare) celulele epiteliale descumate sau exfoliate (din piele, cavitate bucală, faringe, căi respiratorii extra și intrapulmonare, vagin, col uterin, endometru, căi galactofore, lichid cefalo-rahidian, lichid pleural, lichid de ascită), amprente de organe.

Metoda este mult utilizată în citologie, devenind prioritară atât în domeniul cercetării biologice cât și ca procedeu de diagnostic în practica medicală.

2.3.1. Tehnica frotiului de sânge

Executarea unui frotiu de sânge constituie o tehnică de bază a microscopiei clinice, căci după principiile executării sale se execută și frotiurile de măduvă osoasă, suc gastric, sedimente de lichide seroase etc.

Un preparat hematologic sau citologic este inutilizabil dacă este realizat cu o tehnică necorespunzătoare care distruge morfologia elementelor celulare. Numai un frotiu corect executat permite o interpretare microscopică corespunzătoare, utilă diagnosticului sau cercetării biologice.

Lamele pe care se execută frotiul trebuie să fie perfect curățate și

degresate, altfel nu se obțin preparate bune.

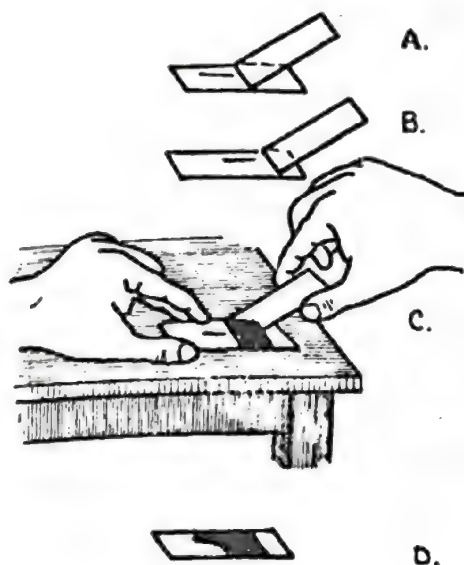


Fig.21. Diferitele etape ale realizării frotiului de sânge

a. Prelevarea sângelui - se face la adult prin punționarea părții laterale a pulpei degetului inelar sau medius, iar la nou născut și sugar din lobul urechii, partea laterală a halucelui sau din călcâi. Locul punționării se dezinfectează și se degresează cu ajutorul unui tampon îmbibat în alcool sau eter.

Se prinde degetul subiectului cu mâna stângă, fixându-l între index și police și printr-o mișcare rapidă se punționează locul dezinfectat cu un ac pentru injecții subcutanate, sterilizat.

Primele două picături se șterg cu ajutorul unei comprese uscate deoarece conțin prea mult lichid interstițial sau impurități de pe piele.

b. Efectuarea frotiului propriu-zis - constă în întinderea pe o lamă portobiect curată a unei picături de sânge într-un strat subțire și uniform.

Picătura de sânge care apare pe pulpa degetului se ridică cu marginea mică a unei lame șlefuite și se aplică pe una din extremitățile unei lame portobiect așezate orizontal.

În momentul contactului cu lama portobiect, se imprimă lamei pe care se află picătura de sânge o mișcare de lateralitate pentru ca sângele să se întindă pe toată linia de contact după care se imprimă lamei șlefuite o mișcare de translație în lungul lamei portobiect.

Frotiu este bine executat dacă are:

- două mărgini laterale și se termină în franjuri;
- o grosime potrivită: elementele figurate să nu fie suprapuse și totodată suficient de dese.

Grosimea frotiului de sânge depinde de:

1. mărimea picăturii de sânge (picătură mică, frotiu subțire);
2. unghiul dintre lama șlefuită și lama portobiect ce trebuie să fie de 30° - 35° (frotiu subțire);
3. viteza de întindere (viteză mare - frotiu gros).

c. Fixarea frotiului - se poate face prin:

- **uscarea** -sau desicare la temperatura laboratorului prin agitarea lamei pentru a obține o uscarea rapidă; uscarea lentă duce la ratatinarea celulelor;
- **soluții fixatoare** - frotiu umed; alcoolul etilic absolut timp de 15 min., alcool etilic absolut și eter în părți egale timp de 5-15 min., alcool metilic timp de 2 min. sau prin vapori de OsO_4 (soluție 2%).

După fixare se execută colorarea preparatului.

2.3.2. Colorarea frotiului de sânge

Frotiul trebuie colorat cât mai curând după realizarea lui (imediat după întinderea lui sau în primele 24 ore) întrucât pe lamele necolorate celulele se alterează pierzându-și afinitatea tinctorială.

Actualmente se folosește colorarea dublă cu soluție May-Grünwald-Giemsa ce dă indicații asupra compoziției chimice a substanței vii celulare.

Compoziția colorantului utilizat:

a. soluția May-Grünwald

- | | |
|----------------------------------|---------|
| + eozinat de albastru de metilen | 1 g. |
| + glicerina neutră p.a. | 50 ml. |
| + alcool metilic p.a. | 100 ml. |

b. soluție Giemsa

- | | |
|---------------------------|---------|
| + eozinat de azur metilen | 3 g. |
| + azur de metilen | 0,8 g. |
| + glicerină neutră | 250 ml. |
| + alcool metilic p.a. | 200 ml. |

Tehnica colorării

Reactivi și materiale necesare:

- soluție May-Grünwald;
- soluție Giemsa;
- apă distilată neutră;
- pipete Pasteur, pipete gradate;

PH-ul apei distilate trebuie să fie 7 sau 7,2. Apa distilată este de obicei acidă. neutralizarea ei se obține adăugând câteva picături dintr-o

Grosimea frotiului de sânge depinde de:

1. mărimea picăturii de sânge (picătură mică, frotiu subțire);
2. unghiul dintre lama șlefuită și lama portobiect ce trebuie să fie de 30° - 35° (frotiu subțire);

3. viteza de întindere (viteză mare - frotiu gros).

c. Fixarea frotiului - se poate face prin:

- **uscare** -sau desicare la temperatura laboratorului prin agitarea lamei pentru a obține o uscare rapidă; uscarea lentă duce la ratatinarea celulelor;

- **soluții fixatoare** - frotiu umed; alcoolul etilic absolut timp de 15 min., alcool etilic absolut și eter în părți egale timp de 5-15 min., alcool metilic timp de 2 min. sau prin vapori de OsO_4 (soluție 2%).

După fixare se execută colorarea preparatului.

2.3.2. Colorarea frotiului de sânge

Frotiul trebuie colorat cât mai curând după realizarea lui (imediat după întinderea lui sau în primele 24 ore) întrucât pe lamele necolorate celulele se alterează pierzându-și afinitatea tinctorială.

Actualmente se folosește colorarea dublă cu soluție May-Grünwald-Giemsa ce dă indicații asupra compoziției chimice a substanței vii celulare.

Compoziția colorantului utilizat:

a. soluția May-Grünwald

- | | |
|----------------------------------|---------|
| + eozinat de albastru de metilen | 1 g. |
| + glicerina neutră p.a. | 50 ml. |
| + alcool metilic p.a. | 100 ml. |

b. soluție Giemsa

- | | |
|---------------------------|---------|
| + eozinat de azur metilen | 3 g. |
| + azur de metilen | 0,8 g. |
| + glicerină neutră | 250 ml. |
| + alcool metilic p.a. | 200 ml. |

Tehnica colorării

Reactivi și materiale necesare:

- soluție May-Grünwald;
- soluție Giemsa;
- apă distilată neutră;
- pipete Pasteur, pipete gradate;

PH-ul apei distilate trebuie să fie 7 sau 7,2. Apa distilată este de obicei acidă. neutralizarea ei se obține adăugând câteva picături dintr-o

soluție slab alcalină de carbonat de sodiu 1% la 500 ml apă distilată, încercându-se pH-ul cu un indicator universal de hârtie; pH-ul apei se mai controlează și prin adaos de câteva cristale de hematoxilină (colorarea apei în roz este indicația de neutralitate - hematoxilina este violet-albastră în mediu alcalin și galbenă în mediu acid);

- se acoperă frotiul cu soluție May-Grünwald și se lasă 2-3 min. (timp în care soluția realizează o fixare a frotiului);

- se adaugă apoi peste soluția May-Grünwald un număr egal de picături de apă tamponată, se omogenizează și se lasă 2 min. (diluată, soluția May-Grünwald acționează ca un colorant);

- se îndepărtează colorantul fără spălare și se acoperă cu soluție Giemsa diluată cu apă distilată tamponată în proporție 1/1 (1 picătură soluție Giemsa pentru un mililitru apă); se lasă 15-20 min.

- se spală lama sub jet de apă;

- sugativare ușoară;

- se așează în stativ pentru uscare;

Colorarea pentru trombocite se face la fel, prelungind doar timpul de colorare cu Giemsa la 45 min. iar spălarea lamei nu se face sub jet puternic de apă fiindcă apa antrenează trombocitele.

Clasa unui element sau gradul lui de maturare se stabilesc pe baza unor criterii ce privesc bazofilia citoplasmei elementelor tinere, afinitatea tinctorială a granulațiilor granulocitelor și acidofilia eritrocitelor mature.

Această metodă de colorare dă indicații asupra pH-ului componentelor celulare. Astfel, coloranții acizi sunt fixați de porțiunile alcaline ale celulei, care sunt acidofile, iar coloranții bazici sunt fixați de părțile acide, care sunt bazofile. De exemplu eozina, colorant acid, este fixată de granulațiile eozinofile ce sunt alcaline ($\text{pH}=11$); albastru de metilen, colorant bazic, este fixat de acidul ribonucleic din citoplasma eritroblastului bazofil colorând-l în albastru; azurul de metilen fixează acidul dezoxiribonucleic din nucleul eritroblastului bazofil. Nucleolul fixează albastru de metilen deoarece conține acid ribonucleic de tip citoplasmic.

Cu cât o celulă este mai tânără cu atât citoplasma ei este bazofilă, dat fiind concentrația mare de acid ribonucleic. Pe măsura măturării celula devine tot mai acidofilă deoarece scade concentrația în acid ribonucleic (ex: evoluția eritroblaștilor).

Termenii de eozinofil, bazofil, acidofil, indică afinitatea față de coloranții acizi.

Examinarea frotiului de sânge colorat, la microscopul fonic se începe cu obiectivul de 10 pentru verificarea calității tehnice a frotiului.

Apoi se pune la punct cu obiectivul cu imersie și se examinează pe rând:

- morfologia eritrocitelor;
- frecvența și morfologia trombocitelor;
- frecvența și morfologia leucocitelor, eventual cu întocmirea formulei leucocitare (exprimarea procentuală a diferitelor forme de leucocite).

Pentru întocmirea formulei leucocitare, se examinează frotiul de sânge pe margine, lama deplasându-se într-o singură direcție, notându-se fiecare tip de leucocit din 100 de leucocite numărate.

Formula leucocitară normală

Granulocite neutrofile nesegmentate	NN = 1-4%
Granulocite neutrofile segmentate	NS = 50-70%
Granulocite eozinofile	E = 1-4%
Granulocite bazofile	B = 0-1%
Limfocite	L = 30-45%
Monocite	M = 4-8%

Pentru a crește gradul de credibilitate a unei formule leucocitare se examinează 200-400 de elemente și apoi se face procentajul fiecărei clase de elemente.

Cifra absolută reprezintă numărul fiecăruia dintre elemente pe mm^3 precum și variațiile reale.

Cifre absolute normale

- neutrofile nesegmentate	50-320/ mm^3
- neutrofile segmentate	3000-4500/ mm^3
- eozinofile	100-200/ mm^3
- bazofile	20-10/ mm^3
- limfocite	1250-2400/ mm^3
- monocite	240-480/ mm^3

Variațiile formulei leucocitare și ale numărului de leucocite în funcție de vârstă (după J. Bernard)

Număr/mm ³	Nou-născut	9 luni	3 ani	10 ani	Adult
	10000-20000	4000-15000	5000-10000	5000-10000	4000-10000
Neutrofile	60-70 %	25-40 %	35-50 %	45-60 %	50-70 %
Eozinofile	1-2 %	1-4 %	1-4 %	1-4 %	1-4 %
Bazofile	0,4 %	0,2 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
Limfocite	20-25 %	50-70 %	45-60 %	40-50 %	30-45 %
Monocite	12 %	8 %	6 %	6 %	6 %

Variații fiziologice ale numărului elementelor sângelui periferic HEMOGRAMA

Eritrocite + variații după sex:

- bărbat adult 4500000-5500000/mm³.
- femeie adultă 4000000-5000000/mm³.

+ variații după vârstă

- la naștere 4500000-7000000/mm³.
- până la 12 ani 4000000-5000000/mm³.

Leucocite

- adulți 4000-9000/mm³.
- la naștere 15000-25000/mm³.

Trombocite

- valori normale 130000-300000/mm³.

Aceste elemente variază nu numai în funcție de vârstă după cum se observă și din tabelul de mai sus ci și după sex. La aceste variații se adaugă cele care survin în cursul unei activități musculare mai intense, în timpul digestiei, în funcție de anotimp, de altitudine (poliglobulie).

În examinarea frotiului de sânge colorat se recomandă ordinea arătată anterior (studiul atent al morfologiei eritrocitelor, a trombocitelor și apoi a leucocitelor), deoarece, începând cu studiul leucocitelor, atrăgătoare prin variațiile lor de formă, structură și culoare, riscăm neglijarea unor detalii, uneori foarte importante ale aspectului hematiilor sau trombocitelor.

2.3.3. *Componentele sângelui periferic evidențiate prin colorația May-Grünwald Giemsa*

2.3.3.1. **Eritrocitul** (hematie sau globul roșu) are un diametru de aproximativ $7,2 \mu\text{m}$ la celula uscată și $8,6 \mu\text{m}$ la hematia proaspătă circulantă.

Celulele de origine ale seriei eritrocitare, care duc în cele din urmă la eritrocit, la individul adult normal, se găsesc în măduva roșie, hematopoetică, localizată în special în oasele late și în epifizele oaselor lungi. Viteza de maturare a celulelor seriei eritrocitare (proeritroblast, macroblast, eritroblast bazofil, eritroblast policromatofil, eritroblast acidofil, reticulocit, eritrocit) este rapidă: trecerea de la eritroblastul bazofil la eritrocit durează 25 ore. În mod normal proeritroblastul este o celulă de rezervă, care nu se divide decât în urma unor stimuli hematopoietici puternici. Eritropoieza este asigurată de diviziunea eritroblaștilor bazofili și policromatofili. Reticulocitele rezultate, părăsesc măduva și trec în circulație unde se maturează după paroximativ 48 ore trecând în eritrocite mature.

Eritrocitul adult este o celulă anucleată, discoidală și biconcavă. Este alcătuit din citoplasmă și membrană celulară. În citoplasmă se găsesc în special macromolecule proteice structurale și protein-enzime precum și cantități mici de lipide, vitamine (mai ales din grupul B) și elementul principal hemoglobulina.

Membrana eritrocitului care a constituit obiect de cercetare intensă, deoarece prin hemoliza eritrocitului în mediu hipoton ea rămâne în forma sa inițială, conservând atât organizarea cât și cea mai mare parte a funcțiilor sale, este alcătuită după tipul unitar de biomembrane. Prezintă pe suprafața sa antigeni numiți aglutinogeni după a căror prezență sau absență, se pot identifica grupele sanguine, de care se ține seama în practica medicală când se efectuează transfuzia de sânge. În afara acestora, pe suprafața externă a membranei eritrocitare s-a evidențiat și factorul Rh.

Eritrocitele au o culoare roșu cărămiziu pe frotiul de sânge colorat cu soluția May-Grünwald Giemsa și o formă rotunjită, văzute din față și de disc biconcav văzute din profil (discocite). Alte forme de eritrocite sunt:

- **sferocitele** - eritrocite rotunde de forma unui balon sau a unei sfere; privite pe frotiu ele sunt bine colorate și mai mici decât eritrocitele normale. Se întâlnesc în icterul hemolitic congenital numit și sferocitoză ereditară; se mai întâlnesc și în anemii hemolitice câștigate;

- **echinocitele** sunt hematii de formă sferică ce prezintă pe suprafața lor prelungiri de dimensiuni egale -țepi- în număr de 20-30 localizate

echidistant. Aceste forme apar atunci când concentrația moleculelor de ATP scade în celulă și în mediul extracelular. Revenirea la concentrația normală duce la transformarea echinocitului în discocit. Echinocitele pot apare și ca forme ireversibile în cazul celulelor îmbătrânite sau în unele boli sanguine.

- **eliptocitele** - eritrocitele ovale care în mod normal se găsesc în sânge, în proporție de 10-15% din globulele roșii, putând fi întâlnite și în unele boli sanguine.

- **stomatocitele** - hematii rotunde ce prezintă într-o anumită zonă o înfundătură ca o gură (stomă); ele apar la un pH ușor scăzut sub 7; revenirea pH-ului la normal determină transformarea lor în discocite; în hemoglobinopatii apar forme ireversibile de stomatocite (fig.22).

- **acantocitele** - hematii de formă rotunjită ce prezintă pe suprafața lor 5-15 prelungiri de dimensiuni inegale și situate la distanțe inegale între ele; apar în ciroze, anorexia nervoasă - fiind numite și "spurr cells".

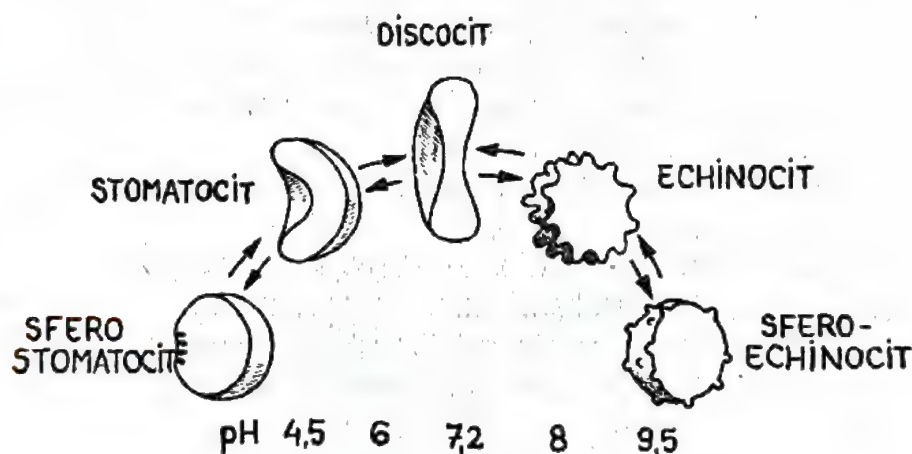


Fig.22. Modificarea formei eritrocitului în funcție de pH.

- **drepanocitele** - hematii în corn sau seceră; se întâlnesc în hemoglobinopatii, (hemoglobinoza S - drepanocitoza), talasemie și deficit de fier în organism.

Acantocitele și drepanocitele sunt forme patologice ireversibile ale hematiei.

Creșterea hematiei determină apariția **macrocitelor**; când diametrul depășește $10\ \mu\text{m}$, vorbim de **megalocite** (acestea apar de obicei în boli sanguine-anemii). Scăderea diametrului eritrocitului sub $7\ \mu\text{m}$ determină apariția în sânge a **microcitelor**. Variațiile de diametru eritocitar poartă

denumirea de **anizocitoză**.

Culoarea eritorcitelor se poate modifica, celulele apărând fie palide (hipocromie) în anemii, fie diferit colorate, în tulburările eritropoiezei.

2.3.3.2. Trombocitul

Trombocitele iau naștere în măduva osoasă hematogenă prin fragmentarea citoplasmei elementelor seriei megacariocitare (megacarioblastul, celula cap de serie, megacariocitul bazofil sau promegacariocitul, megacariocitul granulat netrombocitogen, megacariocitul granulat trombocitogen, trombocitul).

Trombocitele se formează deci din citoplasma megacariocitului, prin diferențierea acesteia, la un anumit stadiu de maturare a celulei. Desprinse din megacariocit, trombocitele trec în stadiu de maturare, având dimensiuni care variază între 2-5 μm și o durată de viață de circa 7-10 zile. În sângele periferic ele se găsesc în proporție de 150000-400000/ mm^3 .

Trombocitul este o "celulă" elipsoidă, cu formă de lentilă biconvexă când se află în stare proaspătă, în vasele sanguine. Pe frotiu, celula prezintă forme diferite, colțuroase ca o stea, discoidală, poligonală etc., depinzând de gradul de uscare a frotiului, de timpul ce s-a scurs între recoltarea sângelui și efectuarea frotiului, etc.

Trombocitul sau placheta sanghină este anucleată, fiind alcătuită din membrană și citoplasmă.

Membrana plachetei sanguine este lipoproteică, acoperită de un strat de glicoproteine care permite absorbția unor proteine plasmatică, în special fibrinogen și factorul 8, jucând un rol în interacțiunea dintre trombocit și peretele vascular sau alte suprafețe străine (adeziune) și cu alte plachete (agregare).

Pe suprafața externă a membranei celulare se găsesc diferite lucruri specifice antigenice, ca și receptori pentru agenții stimulatori sau inhibitori ai procesului de agregare plachetară. Membrana trombocitului mai prezintă și mici ondulații și prelungiri dendritiforme rare.

Citoplasma se prezintă la examenul microscopic alcătuită din două zone: una externă, ectoplasmică, clară, numită **hialomer** și alta centrală, întunecată numită **granulomer**.

Hialomerul conține microtubi, microfilamente și diferite proteine implicate în procesul de coagulare sanguină (ex: trombosteină).

Granulomerul este un ansamblu de granule și vacuole de mărimi diferite; el este alcătuit din mitocondrii mici; câțiva lizozomi ce apar pe frotiu ca granulații azurofile, câțiva peroxizomi ce conțin catalază, microvezicule golgiene, puține profiluri de reticol endoplasmatic și granule dense ce conțin serotonină, epinefrină (adrenalină), ioni de calciu.

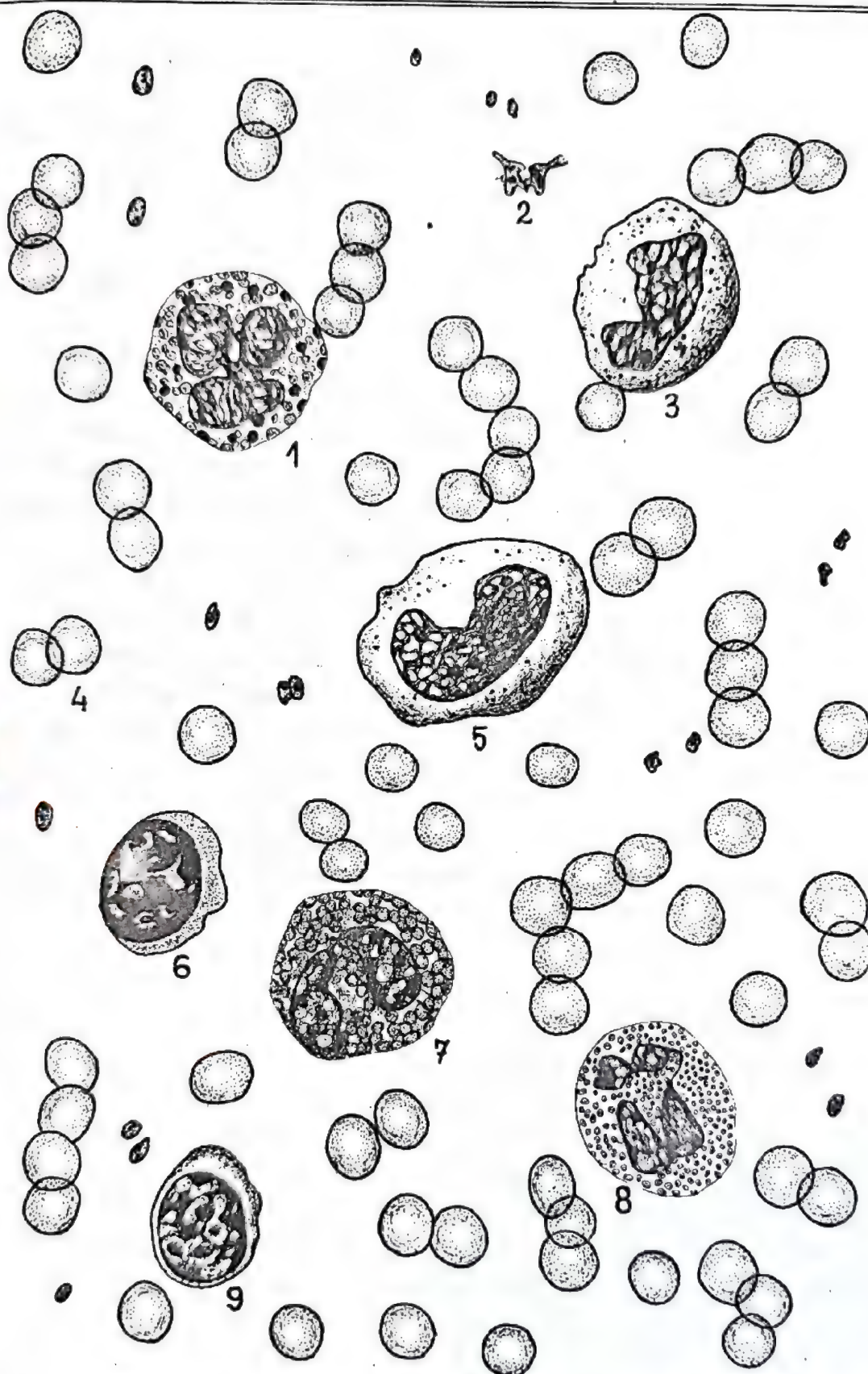


Fig.23. Reprezentarea schematică a elementelor figurate în sângele periferic. 1- bazofil; 2-trombocit; 3-monocit; 4-eritrocit; 5-monocit; 6-limfocit; 7-eozinofi; 8- neutrofil; 9-limfocit.

Trombocitul este o celulă direct implicată în procesul de coagulare a sângelui, intervenind și în procesele inflamatorii, în reacțiile imune, în vindecarea rănilor; poate endocita particule foarte mici (bacterii pe care nu le omoară, particule de cărbune, curățind astfel sângele circulant).

2.3.3. Leucocitele se împart în două clase majore:

a. granulocite (prezintă numeroase granule în citoplasmă) și

b. agranulocite sau leucocite agranulare

a. granulocitele

La individul adult, normal, celulele de origine a seriei granulocitare se găsesc localizate în măduva hematopoietică ca și celulele seriei eritrocitare. Seria granulocitară normală cuprinde: mieloblastul (celula cap de serie), promielocit (stadiul din care se poate preciza direcția în care va evolua celula, deoarece are loc diferențierea progranulațiilor în cele trei tipuri: neutrofile, eozinofile, bazofile), mielocit, metamielocit, granulocitul nesegmentat (prima celulă din serie ce poate fi găsită în mod normal în sângele periferic, în proporție de 1-5%), granulocitul segmentat. Celulele acestei serii sunt caracterizate prin apariția în citoplasma lor a granulațiilor, la început azurofile, nediferențiate și pe măsură ce se produce maturarea diferențiindu-se în cele trei tipuri: fie neutrofile, fie eozinofile, fie bazofile. O caracteristică importantă a granulocitelor, indiferent de caracterele granulațiilor, este prezenta în celule a unor oxidaze și peroxidaze încă din stadiul de promielocit, prin care se deosebesc celulele tinere ale acestei serii de celule tinere ale seriei limfocitare.

Deci granulocitele se împart în trei clase după tinctorialitatea granulelor specifice din citoplasmă:

1. **Neutrofilele** se găsesc în proporție de 40-75% în sângele periferic; au o formă rotunjită în sângele circulant; această formă se modifică când neutrofilele se detașează pentru a părăsi vasul și a trece în țesuturi prin emiterie de pseudopode (formă neregulată, adeseori de rachetă); au un diametru de 12-15 μm și de numai 9-12 μm când celula este uscată (pe frotiul sanguin).

Nucleul este segmentat prezentând 2-5 lobi nucleari, legați între ei prin filamente fine de cromatină; așezarea lor în neutrofil realizează forme diferite asemănătoare literelor din alfabet (U, V, W, T, S etc.). La unul din lobii nucleari, la 1-5% din neutrofilele persoanelor de sex feminin, se observă prezența corpusculului Barr, condensarea în intercineză a unuia din cei doi cromozomi X.

La bărbați cromozomul Y este mult mai mic ca dimensiuni și nu

poate fi observat la examenul obișnuit cu microscopul fonic; cu greu poate fi observat la 3,5% din neutrofile prin examenul cu fluorescență, după colorare cu chinacrină. Corpusculul sexual apare la microscop ca o prelungire a lobului nuclear, sub forma unui băț de tobă. Cu cât neutrofilul este mai tânăr, cu atât numărul lobilor nucleari este mai mic.

În colorația utilizată (May-Grünwald Giemsa) nucleii neutrofilelor prind o tentă roșie violacee dată de eozinatul de albastru de metilen.

Citoplasma neutrofilelor este ușor acidofilă colorându-se în roz palid. Conține organite celulare puțin dezvoltate și elementul structural caracteristic este reprezentat de numeroase **granule** ce diferă ca diametru și colorabilitate de la o specie la alta (heterofile); la om, numărul lor diferă de la o celulă la alta (50-200). Granulele neutrofilului sunt de două tipuri:

- **granule azurofile** sau **primare** prezente în exclusivitate în primele etape de dezvoltare a neutrofilelor la nivelul măduvei hematogene, reducându-se treptat pe măsura diferențierii celulei și trecerii ei în sângele periferic. Ele sunt lizozomii neutrofilelor și conțin hidrolaze acide, lizozim ce are rolul de a hidroliza glicozidele din peretele bacteriilor-agent bacteriostatic; mai conțin mieloperoxidază prin care sunt bactericide acționând asupra H_2O_2 , (eliberează și activează O_2).

- **granule specifice** sau **secundare** ce conțin lizozim, lactoferin (complex enzimatic cu rolul de a lega fierul circulant, sustrăgându-l bacteriilor, care astfel nu se vor mai putea dezvolta intrând într-un ciclu involutiv), fagocitine, cu rol bacteriostatic, fosfatază alcalină, acid lactic, acizi grași și lecitine, toate având rol inhibitor asupra dezvoltării microorganismelor. Ele se colorează cu tehnica prezentată în brun mai mult sau mai puțin închis.

Membrana celulară este lipoproteică, acoperită de glicocalix; ea emite frecvente pseudopode bogate în microfilamente de actină și microtubi ce asigură migrarea celulei din sânge, către și prin țesuturi.

Dintre **funcțiile** neutrofilului amintim faptul că este un microfag (fagocitează particule de talie mică).

2. **Eozinofilele** numite și granulocite acidofile se găsesc în proporție de 1-5% din elemente le seriei albe.

Nucleul este de obicei bilobat-doi lobi uniți prin punți fine de cromatină, lobii nucleari conținând eucromatină dispusă central și heterocromatină lângă membrana nucleară. În colorația May-Grünwald Giemsa nucleul are o tentă roșu violaceu.

Citoplasma este intens acidofilă, se colorează în roz, conține organite celulare mai bine reprezentate ca în citoplasma neutrofilului și frecvente

granule colorate în portocaliu strălucitor în colorația May-Grünwald Giemsa. Granulele eozinofilului conțin hidrolaze acide de tip lizozomal și histone - după unii autori conțin histamină sau acetilcolină.

Membrana este organizată după tipul general al biomembranelor, la nivelul ei apărând pseudopode rare și mici, celula prezentând mișcări ameboide.

Dintre funcțiile eozinofilului amintim faptul că este un microfag cu putere redusă de fagocitoză, selectivă pentru factorii bacterieni solubili. Are și un rol antihistaminic acumulându-se în țesuturile sau zonele cu histamină în concentrație ce depășește normalul, intervenind astfel în bolile parazitare și alergice ce sunt însoțite de eozinofilie. În tumori, în special în boala Hodgkin, eozinofilele prezintă reacții de tip imun. Ele conțin și profibrinolizină prin care se pare că intervin în procesele de coagulare sanguină.

3. **Bazofilele** se găsesc în sângele periferic în proporție de 0,5% din elementele albe, sunt mai mici decât neutrofilele și eozinofilele, au o formă ușor rotunjită; **nucleul** apare incomplet segmentat având adesea forma unei frunze incomplet lobate, a literei "S", sau de trifoi; **citoplasma** este bazofilă, conține puține organite celulare dar mai multe **granule**, de formă și dimensiuni diferite, ce apar colorate metacromatic în albastru-violet închis.

În unele bazofile, granulele sunt răspândite pe toată aria citoplasmei acoperind deseori și nucleul în timp ce în altele apar concentrate în ectoplasmă sau perinuclear. Ele sunt foarte sensibile, dispar repede în apă datorită glicozamino-glicanilor acizi pe care îi conțin. O parte din aceste granule sunt lizozomi dar, cele mai multe, pot fi considerate granule specifice ce conțin histamină, heparină, serotonină și o substanță slab reactivă de natură lipidică, probabil din același grup cu prostaglandinele.

Membrana este lipoproteică acoperită de glicocalix și prezintă pe suprafața externă receptori pentru Ig.E.

Bazofilele intervin în stări inflamatorii, stări de șoc, se stress datorită substanțelor conținute în granulele specifice, pe care le eliberează la contactul cu unii antigeni, deplasându-se în țesuturi prin mișcări ameboide.

b. leucocite agranulare

1. **Limfocitul**

Celulele de origine a seriei limfocitare se găsesc în foliculii limfatici ai ganglionilor limfatici, în foliculii limfatici diseminați în organism etc.

Seria limfocitară normală cuprinde: limfoblast, prolimfocit, limfocite cu dimensiuni și caracteristici morfologice variate în funcție de gradul lor de maturitate. Limfoblastul și prolimfocitul în mod normal nu trec în sângele

periferic.

Limfocitul se găsește în sânge în proporție de 25-45% din elemente albe. Limfocitul circulant este rotunjit sau ușor oval.

Nucleul limfocitului este mare și ocupă o porțiune întinsă din citoplasmă. În interiorul lui se găsește o cantitate mare de heterocromatină sub formă de bulgări bazofili, ceea ce face ca în frotiul de sânge să apară tahicromatic, intens colorat, ca o pată de cerneală.

Citoplasma este redusă la un inel perinuclear, este bazofilă, asemănată cu cerul senin; conține organite celulare slab reprezentate și deseori câteva granulații azurofile.

Membrana este lipoproteică, organizată în mozaic și acoperită cu un strat subțire glicoproteic.

Limfocitele prezintă mișcări de locomoție foarte active, înaintând tot așa de rapid ca granulocitele dar nu fagocitează; în mișcare iau adesea forma de oglindă cu mâner (citoplasma+nucleul); prezintă deasemenea și mișcări intracitoplasmatică foarte vii, ce deplasează organitele dintr-o parte în alta în citoplasmă.

2. Monocitul

Originea monocitelor este în sistemul reticulo-histiocitar în toate organele și țesuturile. Monoblastul, care dă naștere monocitului circulant, ia naștere din celula reticulară, nu numai din organele hematopoietice dar și din toate țesuturile: se întâlnește atât în amprente de organe (ca plămâni, ficat) cât și în cele din țesutul subcutanat. Seria monocitară cuprinde: monoblast (în stare normală fiind imposibil să se prevadă dacă un monoblast va evolua sau nu spre un monocit), promonocitul (stadiu mai diferențiat ce permite un diagnostic citologic; el rămâne în mod normal în țesuturi; dacă evoluează spre monocit, citoplasma se încarcă cu numeroase granulații azurofile, devine o celulă matură, monocitul (forma matură a seriei) care se găsește în mod obișnuit în sângele periferic.

Monocitul se găsește în sângele periferic în proporție de 6-8% din elemente albe, are o formă rotunjită, este cea mai mare celulă din sângele periferic 20-25 μm .

Nucleul nesegmentat apare deseori uniform. Cromatina are un aranjament mai particular, asemănător cu o tablă de șah în care heterocromatina reprezintă zonele întunecate iar eucromatina zonele clare.

Citoplasma este abundentă, bazofilă, se colorează în albastru-cenușiu ca cerul înainte de furtună. În citoplasmă se găsesc organite celulare relativ abundente, granule azurofile (lizozomi) concentrate în scobitura nucleului și uneori resturi celulare pe cale de dezintegrare, celulele fiind macrofage.

Membrana celulară este lipoproteică și prezintă numeroase microvilozități, vezicule de pinocitoză și micropinocitoză. Membrana emite frecvent pseudopode prin care monocitul se deplasează în afara vasului, dar mai încet decât granulocitul. Membrana monocitului, ca și a macrofagului, forma sa activă, conține receptori pentru Ig.G. (subclasele Ig.G₁ și Ig.G₃) și pentru C₃. În ceea ce privește funcțiile monocitului amintim doar rolul său major: fagocitează în general particule de talie mare (bacterii, virusuri, complexe antigen-anticorp, corpuri străine anorganice, celule întregi sau resturi de celule).

2.3.4. Tehnica frotiului din materialele biologice provenite din organe ușor accesibile care prezintă o descumare fiziologică

Aceste preparate se fac din secrețiile: vaginale, mamare, bronșice, prostatice și din celule provenite din descumarea epiteliilor mucoaselor: bucală, nazală, oculară.

Recoltarea acestor materiale se face cu ajutorul unor spatule din sticlă, din metal sau tampoane sterile de vată sau tifon după care se etalează într-un strat subțire pe lame port-obiect degresate.

Imediat după efectuarea frotiului, fără a-l usca, lamele se introduc într-un amestec de alcool etilic absolut și eter în părți egale timp de 15 min., putându-se folosi și alte amestecuri fixatoare în raport de ceea ce dorim să obținem. După fixare urmează colorarea.

2.3.5. Tehnica frotiului din materiale biologice provenite din organe mai puțin accesibile

Aceste materiale biologice provin din spălăturile gastrice, puncțiile pleurale și peritoneale (pleurezie, ascită, puncții ganglionare, etc).

În cazul în care aceste probe nu pot intra imediat în lucru, pentru conservarea celulelor este necesară fixarea lor. Cel mai bun fixator este alcoolul etilic 50%; pentru aspiatele gastrice se utilizează alcoolul etilic 95%.

Produsele care urmează a fi examinate prin această metodă, fixate sau nu, se centrifughează la 1500-4000 rotații/minut timp de 10-30 min. După centrifugare lichidul supernatant se îndepărtează iar din sediment, cu o ansă se ia o picătură și se depune pe o lamă de sticlă pe care s-a întins un strat subțire de albumină Mayer. Chiar dacă lichidele biologice au fost fixate cu soluția de alcool etilic 50%, frotiurile umede obținute din ele se fixează timp

de 15 min. într-o baie cu alcool etilic absolut - eter în părți egale. Urmează colorarea.

2.3.6. *Tehnica amprentelor de organe*

Organul de examinat se secționează transversal prin zona care prezintă interes diagnostic. Secționarea se face cu un bisturiu sau lamă bine ascuțite pentru a evita deformarea sau strivirea țesuturilor.

Cu ajutorul unei pense se prinde fragmentul ales și se apasă ușor cu fața secționată pe lama portobiect degresată. Se fixează cu alcool etilic absolut - eter în părți egale timp de 15 min. după care se colorează.

2.3.7. *Tehnica colorării frotiurilor din sedimente celulare și amprente de organe*

Frotiurile de celule epiteliale descuamate sau exfoliate (cavitate bucală, vagin, prostată, uretră etc.), de sedimente celulare (urină, suc gastric, bilă, lichid cefalorahidian, lichid pleural, lichid ascitic) sau amprente de țesuturi sau organe parenchimatoase se pot colora cu May-Grünwald Giemsa sau hemalaun eozină după tehnica descrisă în capitolele anterioare.



III COLORAREA ȘI COLORANȚII ÎN BIOLOGIA CELULARĂ

3.1. COLORANȚII ȘI MECANISMELE COLORĂRII

Capitolul cuprinde noțiuni fundamentale privind coloranții și mecanismele generale ale colorării precum și importanța acestora pentru evidențierea unor structuri celulare.

Colorarea structurilor celulare și tisulare este un fenomen foarte complex și încă incomplet elucidat, în care intervin factori fizici și mecanisme chimice.

3.1.1. Coloranții. Generalități.

Toți coloranții, în sensul strict al termenului utilizat în tehnica citologică, sunt compuși organici, marea lor majoritate corespunzând seriei aromatice. Un colorant este un produs ce poate colora durabil o substanță sau un ansamblu de substanțe. Pentru aceasta au nevoie de:

1. grupări atomice specifice ce conferă culoarea numite **cromofore**
2. grupări ce permit o fixare permanentă pe substanța de colorat numite grupări **auxocrome**.

Numărul grupărilor cromofore este destul de mare; tabelul de mai jos prezintă formulele structurale ale principalelor grupări cromofore prezente în coloranții utilizați în citologie.

Se știe că fenomenul "culoare" este legat de absorbția selectivă de către o substanță dată a unor anumite lungimi de undă din spectrul vizibil astfel încât lumina reflectată de această substanță apare colorată; responsabile de această absorbție selectivă sunt grupările cromofore. Compușii organici ce conțin grupări cromofore sunt numiți și "cromogeni".

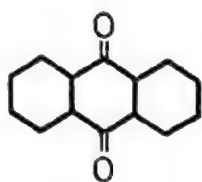
Cromogenii nu sunt obligatoriu cloloranți deoarece ei necesită prezența unei grupări ce le conferă proprietatea de a se ioniza, permițându-le fixarea grupărilor auxocrome.

Grupările auxocrome din punct de vedere chimic sunt, cel mai adesea, funcții simple, fără duble legături, polare sau semi-polare. Grupările hidroxil, amino, carboxil, cian, sulfonil sunt principalii auxocromi.

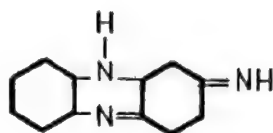
Grupări chimice care nu sunt nici cromofore nici auxocrome pot interveni modificând culoarea unui colorant; printre acestea sunt grupări metil, fenil etc.

Se admite existența unui raport între puterea de colorare a compușilor cu duble legături conjugate și schimbarea rapidă a configurației moleculare, acesta jucând un rol esențial alături de absorbția undelor electromagnetice. Legăturile duble cu electroni mobili, sunt la originea caracterului cromofor a grupărilor nesaturate.

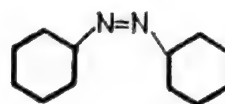
Principalele grupări cromofore



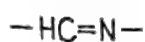
antrachinonă



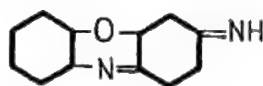
azină



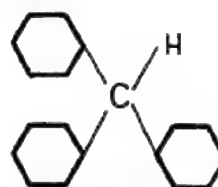
azoică



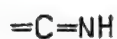
azometină



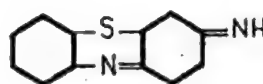
oxazină



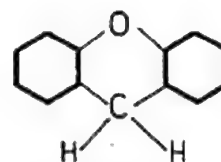
trifenilmetan



cetimină



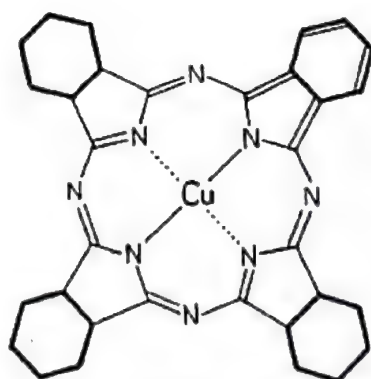
tiazină



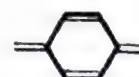
xantină



indamină



ftalocianină



chinonă

3.1.2. Clasificarea coloranților

Coloranții utilizați în citologie pot fi clasificați după mai multe criterii:

1. *După origine:*

- **naturali**, de origine vegetală (hematoxină, safranină) sau de origine animală (carminul)
- **sintetici** (albastru de metil, etc.)

2. *După natura auxocromilor* ce determină și comportamentul lor în soluție, coloranții se împart în:

- a. **coloranți acizi** sau anionici
- b. **coloranți bazici** sau cationici
- c. **coloranți neutri**

Termenul de acid sau bazic nu se referă la caracterul acid sau bazic al soluțiilor colorante; clasificarea se referă la auxocromi:

a. Coloranții conținând **auxocrom anionic** (ex: CO_2H) sunt **coloranți acizi** ce colorează componentele subcelulare încărcate pozitiv; cel mai utilizat colorant acid este eozina ce colorează în roz citoplasma.

b. **coloranții bazici** conțin **auxocromi cationici** (ex: NH_2). Ei colorează componentele subcelulare încărcate negativ, cei mai utilizați fiind: tionina, violet de metil, hemalaunul.

c. **coloranții neutri** sunt purtătorii de **grupări cationice și anionice**; se obțin din soluții apoase de coloranți bazici și coloranți acizi amestecate în anumite proporții; de ex: eozinatul de albastru de metilen și eozinatul de azur de metilen.

3.1.3. Mecanismele colorării

Mecanismele fixării coloranților pe structurilor celulare sau tisulare sunt complexe, realizându-se prin intermediul unor factori fizici și a unor mecanisme chimice în proporții variabile. Marea majoritate a reacțiilor de colorare au însă o explicație în special chimică; proteinele ce nu sunt extrase în cursul prelucrărilor ce preced colorarea, reprezintă substratul molecular la nivelul căruia se atașează coloranții. Anumite colorații nu par să evidențieze decât parțial mecanisme chimice, de aceea s-au luat în considerare și unii factori fizici printre care:

- 1. *penetrarea pur mecanică* a colorantului în interiorul anumitor structuri tisulare prin osmoză sau capilaritate;
- 2. *adsorbția* ce joacă un rol important în colorațiile diferențiale a

unor elemente tisulare (anumiți ioni fiind adsorbiți mai ușor decât alții de anumite substanțe) și în fenomenele de mordansare, atât de importante în anumite tehnici citologice;

3. *absorbția* legată de structura fizică a constituenților tisulari.

3.1.4. *Principalele metode de colorare*

Tehnicile de colorare se clasifică după următoarele criterii:

1. *Numărul coloranților utilizați:*

- **simple**, când se folosește un singur colorant, fie nuclear (hematoxilina), fie citoplasmatic (eozina);

- **combinat**, când secțiunile se colorează succesiv cu doi sau mai mulți coloranți (dublă: hematoxina-eozina, triplă-hematoxilina-eozina-albastru de metilen) sunt folosite pentru colorarea în mod diferențial a diverse elemente ale unui țesut și a facilita astfel analizarea structurii lui.

2. *Utilizarea unor adjuvanți:*

- **directă**: colorantul se fixează prin simplul contact cu secțiunea (colorarea cu hematoxilin-eozină);

- **indirectă sau prin mordansare** - necesită prezența unui mediator sau mordant (alaunurile, iodul, sărurile de fier, etc.) care fixează colorantul de componentele celulare; combinația dintre colorant și mordant se numește **lac**.

3. *Intensitatea colorării*

- **progresivă** - se fac încercări succesive sub control microscopic până se ajunge la tenta de culoare optimă a structurii celulare după care se oprește colorarea prin spălare (de ex: hemalaunul colorează nucleii tuturor tipurilor de celule în albastru, în 4-6 minute; dacă lăsam secțiunile mai mult timp în contact cu colorantul, se colorează și alte structuri celulare);

- **regresivă** - se face o supracolorare care prinde și alte structuri celulare decât cele dorite, după care, excesul de colorant, este îndepărtat prin substanțe decolorante sau diferențiatorii (de ex: după ce am colorat secțiunea în negru intens cu hematoxilină ferică Heindenhain, introducem lama într-o soluție de alaun de fier amoniacal până în momentul în care a rămas colorată numai cromatina nucleară, celelalte elemente celulare-mitocondriile, centrul celular-decolorându-se).

4. *Starea materialului*

- **colorația vitală** se face pe celule în stare vie prin utilizarea unor coloranți vitali și care persistă numai atât timp cât supraviețuiește celula; se utilizează pentru evidențierea unor organite celulare (mitocondrii-verde

Janus B sau complex Golgi-roșu neutru) și a unor activități fiziologice celulare.

- **colorația permanentă** se face prin colorarea unor preparate permanente.

3.1.4.1. Colorarea secțiunilor la parafină necesită o serie de timpi executați înainte și după colorația propriu-zisă.

a. etapa de precolorare cuprinde:

1. **Deparafinarea** - secțiunile parafinate lipite pe lamă se deparafinează trecându-le prin băi succesive cu solvenți ai parafinei: xilol, benzen, toluol 5-10 min. , deoarece parafina împiedică colorarea.

2. **Hidratarea** - este necesară eliminarea solventului parafinei pentru a face posibilă colorarea. Se realizează prin trecerea secțiunilor în 5 băi de alcool etilic în concentrații descrescânde (3 băi cu alcool absolut, apoi 96 % și 70%) timp de 1-2 min.

Apoi secțiunile se trec în apă distilată dacă soluția colorantă este apoasă. În cazul folosirii unei soluții colorate alcoolice se efectuează aceleași operații, omițându-se trecerea în apă distilată, secțiunile transferându-se direct în soluția colorantă alcoolică.

b. colorarea propriu-zisă

c. etapa de postcolorare

1. **Spălarea** cu apă distilată este necesară pentru orpirea colorării și îndepărtarea excesului de colorant.

2. **Deshidratarea** este absolut necesară pentru obținerea unui preparat microscopic permanent. Se face prin trecerea secțiunilor colorate prin 5 băi de alcool etilic de concentrații crescânde (70%, 96% și 3 băi cu alcool etilic 100%).

3. **Clarificarea** îndepărtează alcoolul din secțiuni și le conferă o transparență necesară examinării lor la microscop; se face prin trecerea secțiunilor în trei băi succesive de xilol, toluol, benzen.

4. **Montarea lamelei pe secțiunile colorate**

Montarea are triplu scop; protecția mecanică a secțiunilor, conservarea cât mai mult timp posibil a colorațiilor sau reacțiilor histochimice și obținerea unui grad de transparență și a unui indice de refracție avantajos din punct de vedere optic.

Mediile de montare folosite în realizarea unor preparate microscopice permanente pot fi:

a. **apoase** (miscibile cu apa): glicerină-gelatină, sirop Apathy, etc. Se folosesc în cazul în care secțiunile nu au fost deshidratate. Indicile lor de

refracție este însă net inferior față de cel al mediilor anhidre, ceea ce reprezintă un inconvenient deoarece este vorba de secțiuni colorate; de asemenea, un număr mare de colorații nu se conservă bine în aceste medii.

b. mediile de montare miscibile cu alcoolul - necesită o deshidratare a preparatelor mergând până la alcool 80° sau chiar 85°. Folosirea lor este indicată atunci când se dorește evitarea folosirii alcoolului absolut și a hidrocarburilor benzenice necesare când se folosește balsamul de Canada sau alte rășini sintetice. Cel mai utilizat dintre aceste medii miscibile cu alcoolul este **euparolul** (Gilson 1906). După mulți autori, conservarea majorității colorațiilor și reacțiilor histochimice este foarte bună. Avantajul principal al utilizării pentru montare a euparolului este evitarea deshidratării prin alcool absolut a secțiunilor în celoidină nelipite: este indicația principală a acestui procedeu.

Montarea propriu-zisă se realizează punând 1-2 picături din mediul de montare pe lama cu secțiunea lipită și colorată pe care se aplică apoi o lamelă de sticlă.

În această etapă, esențială este manipularea lentă a lamei pentru a se evita formarea bulelor de aer între lamă și lamelă.

Scoaterea bulelor de aer se face prin apăsarea ușoară pe lamelă cu un ac de disociat. Preparatele astfel montate se pun la termostat la 37°C, 10-12 ore sau la temperatura camerei dar ferite de praf 1-2 zile, în vederea uniformizării grosimii stratului și uscării mediului de montare.

c. anhidre, rășinoase (miscibile cu hidrocarburi benzenice) ex: balsam de Canada ce necesită nu numai deshidratarea completă a secțiunilor dar și impregnarea cu un solvent al materialului de montare, deci cu o hidrocarbură benzenică. Alături de balsamul de Canada se pot folosi și alte rășini sintetice.

5. Etichetarea preparatului este ultima etapă în obținerea unui preparat microscopic permanent: constă în lipirea unei etichete pe port-obiect, pe fața cu secțiunea colorată, pe care se trec datele înregistrate în condica de lucru și colorația făcută. Preparatele microscopice se păstrează în cutii sau histoteci, ferite de lumină și praf.

3.1.4.2. Tehnica colorării cu hemalaun-eozină (HE).

Colorația cu hemalaun-eozină este probabil cea mai răspândită colorație de rutină în majoritatea laboratoarelor de citologie normală și patologică, fapt ce impune și justifică necesitatea cunoașterii acesteia. Metoda colorației cu hemalaun-eozină folosește succesiv un colorant nuclear

bazic, hemalaunul (hemateină+alaun de K) și un colorant citoplasmic, acid, care este în general eozina.

Hematoxilina este un compus natural, de origine vegetală (extrasă din *Haematoxylon campechianum*) a cărei utilizare pentru colorarea țesuturilor vegetale sau animale era cunoscută de indigenii din America centrală înainte de cucerirea spaniolă. Introdusă apoi în Europa, a fost utilizată în industria textilă.

Formula ei stabilită încă din 1810 de Chevreul este: $C_{16}H_{14}O_6$. Se știe de asemenea că hematoxilina însăși nu este un colorant și că ea capătă această proprietate după oxidarea în hemateină ($C_{16}H_{12}O_6$ - pierderea celor doi atomi de hidrogen făcându-se fără intrarea oxigenului în moleculă).

Oxidarea hematoxilinei, denumită curent maturare, se face:

- prin maturare naturală - expunere prelungită la aer;
- prin maturare artificială - tratare cu agenți oxidanți;

Se preferă însă procesul de maturare lentă, naturală. Hemateina utilizată în tehnica citologică sub formă de lacuri, prin mordansare cu un alaun (alaun de K), se numește hemalaun.

Ea permite obținerea unei colorații nucleare bune în albastru violet. Numărul formulelor de hemalaun folosite este mare (ex: hemalaunul Hansen, Mason, etc.).

Eozina. Există în realitate mai mulți coloranți care poartă numele de eozină. Toți sunt derivați de xantină și mai precis din fluoresceină. Printre ei este și eozina Y (sau eozina galbenă) care dă cele mai bune rezultate în asociere cu hemalaunul.

Acest colorant este sarea de sodiu a derivatului tetrabromat al fluoresceinei. Mai este numit și eozina hidrosolubilă. Derivații săi metilați și etilați sunt mult mai puțin folosiți (eozina etilată sau eozina S, solubilă în alcool este utilizată pentru punerea în evidență a corpusculilor Negri ai turbării).

Eozina B sau albăstră, derivatul dibromat al dinitrofluoresceinei, este utilizată mai rar ca eozina Y în asociere cu hemalaunul, dovedindu-se utilă atunci când este combinată cu azur A sau albastru de toluidină.

Timpii acestei metode sunt:

1. operațiunile etapei de precolorare: deparafinare, hidratare.
2. colorarea propriu-zisă ce cuprinde:
 - a) introducerea secțiunilor hidratate într-o baie care conține hemalaun, timp de 5-10 min;
 - b) spălarea în apă curgătoare 5-10 min;
 - c) diferențierea în alcool clorhidric (alcool 96° - 100 ml. soluție acid

clorhidric - 0,5 ml.) când nucleii sunt supra colorați. Pentru virare, secțiunile se trec în soluția saturată de carbonat de litiu;

d) introducerea secțiunilor spălate într-o baie cu soluție apoasă de eozină 1% timp de 1-2 min;

e) spălarea secțiunilor timp de câteva secunde în apă distilată pentru eliminarea excesului de colorant;

h) sugativarea ușoară.

3. operațiunile etapei de postcolorare:

deshidratare, clarificare, montarea lamelei, etichetare.

Rezultate.

- *nucleii* apar colorați în albastru violet cu hemalaun. Hemalaunul este un colorant bazic deci, conținutul nuclear este bazofil (principalii constituenți chimici ai nucleului, ADN și ARN, posedă radicali fosfat acizi ce reprezintă locuri de atașare pentru colorantul bazic-hemalaunul).

- *citoplasma* se colorează în roz cu eozina. Eozina este un colorant acid, deci citoplasma este acidofilă (cele mai multe proteine citoplasmice se comportă la pH-ul respectiv ca baze, expunând grupările NH_3^+ care, reprezintă locul de atașare pentru colorantul acid-eozina).

În cazul în care se folosesc secțiuni de ficat uman pentru colorare cu HE se observă: hepatocitele dispuse în cordoane celulare, separate prin spații în care sunt capilarele sanguine (sinusoide); în citoplasma acidofilă a hepatocitelor pot fi observate uneori formațiuni granulare bazofile, colorate în albastru-violet-**corpui Berg** - ce reprezintă ergastoplasma (aglomerări de REG suficient de mari pentru a fi detectate la microscopul fonic) cantitatea mare de ARN, datorată ribozomilor atașați membranei RE, reprezintă substratul acestei bazofilii.

- spațiile goale, necolorate în citoplasma hepatocitelor; aceste spații goale reprezintă locurile ocupate de: **incluziuni granulare de glicocen** (ce nu se colorează cu HE), spațiile ocupate de granulele de glicogen apar neregulate și cu un contur neclar; **incluziuni granulare lipidice** - locurile ocupate de acestea, apar sub formă sferică.

3.1.4.3. Colorații nucleare

Colorațiile nucleare utilizează coloranți bazici: hematoxilina, kernechtrot, albastru de toluidină, safraniană, etc.

1. *Colorația cu hematoxină ferică Heidenheim.*

Cel mai utilizat colorant este hematoxilina ferică Heidenheim care oferă detalii structurale nucleare prețioase; el mai evidențiază incluziuni celulare

și striatiile mușchilor striati.

a. Se prepară o soluție mamă de hematoxină 10% în alcool etilic 96° care se lasă să se matureze la lumină 2-3 săptămâni.

b. Prepararea soluției colorante 1%.

- soluție hematoxină 10%.....10 ml.

- apă distilată.....90 ml.

c. Înaintea colorării, preparatele vor fi **mordansate** (operație intermediară între fixare și colorare care are drept scop creșterea selectivității pentru colorant a structurii citologice).

Mordantul utilizat:

- alaun de fier și amoniu (cristale violete)....3 g.

- apă distilată.....100ml.

d. **Diferențiatorul** este tot o soluție de alaun, de o concentrație mai mică.

- alaun de fier și amoniu (cristale violete).....1-2 g.

- apă distilată.....100ml.

e. **Tehnica de lucru.** Secțiuni la parafină sunt aduse la apă.

- Mordansare pentru nucleu 30 min, pentru alte structuri până la 24 ore.

- Colorare hematoxină Heidenheim 1%....30 min-24 ore.

- Spălare rapidă în apă distilată.

- Diferențiere sub microscop.

- Spălare în apă distilată.

- Colorare de fond.

- Deshidratare, clarificare și montare în balsam de Canada.

f. **Rezultate:** cromatina apare colorată în negru-albăstrui, citoplasma incoloră; colorația prelungită mai pune în evidență centrosonii, granulele de secreție.

2. Colorarea cromatinei sexuale (corpusul BARR).

Studiul cromatinei sexuale și poate face pe frotiuri de mucoasă bucală sau vaginală, amprente de biopsii cutanate și pe secțiuni la parafină. Rezultatele cele mai bune le oferă variantele clasice ale metodei Feulgen și Rossenbeck (pentru acizii nucleici). Prezentăm mai jos tehnica propusă de Klinger și Ludwig (1957) care dă rezultate mulțumitoare și e mai puțin laborioasă.

a. Fixare în alcool etilic 96° pentru frotiuri timp de 30 min-3 ore, pentru piese din țesuturi sau organe, fixarea se face în lichidul Davidson.....3-24 ore.

- alcool etilic 96°.....30 ml.

- formol 40%.....20 ml.

- acid acetic.....10 ml.
- apă distilată.....30 ml.
- b. Secțiuni deparafinate și deshidratate.
- c. Hidrolizare soluție HCl 5N.....20 min.
- d. Spălare în apă distilată.
- e. Colorare 15-60 min. în amestecul:
 - soluție saturată de tionină în alcool etilic 50°.....40 min.
 - tampon Michaelis pH 6,4.
 - soluție HCl 0,1 N.....19,6 ml.
 - veronal sodic 0,1 M.....20,4 ml.
- f. Spălare repetată în apă distilată, apoi în alcool etilic 50°.
- g. Îndepărtarea excesului de colorant cu alcool etilic 70°.
- h. Deshidratarea, clarificare, montare în balsam Canada.
- i. **Rezultate:** corpusculul Barr este colorat în albastru intens, alți cromozomi în albastru deschis, fibrina și mucinele metacromatice (roșu la violet).

3. Colorarea nucleolilor.

Nucleolii, structuri constante ale nucleilor celulelor eucariote, de formă sferică, foarte refringenți în celula vie, în general omogeni în microscopia fonică pe preparate fixate, cu aspect electronodens, este implicat în sinteza ARN ribosomal care se acumulează la acest nivel, înainte de a trece în citoplasmă.

Datorită componenței cromosomiale situată la exteriorul nucleolului, metoda lui Estable și Sotelo pune în evidență această structură periferică numită nucleolonemă (metoda pyrogallol-fer).

- a. Fixarea în formol, amestec Sanfelice sau alți fixatori pe bază de trioxid de crom.
- b. Secțiuni deparafinate și hidratate.
- c. Imersia secțiunilor într-o soluție apoasă de alaun de fer 3%.....1-2 min.
- d. Spălare rapidă în apă distilată.
- e. Imersia secțiunilor într-o soluție apoasă de fericiaură de K 1% în care, după 30 secunde se adaugă 7-10 picături din soluția apoasă de pirogalol 2%; colorația este aproape instantanee.
- f. Spălarea în apă curgătoare.
- g. Deshidratare, clarificare, montare în balsam de Canada.
- h. **Rezultate:** nucleololema (componentă cromosomală) se colorează în albastrui închis, aproape negru. Nucleolul se poate evidenția și prin alte metode de colorare nucleară (hematoxilina ferică Heidenheim).

3.1.4.4. Colorații citoplasmaticice

Din punct de vedere tinctorial, citoplasma are afinitate pentru coloranți acizi. Cei mai utilizați sunt: eozina în soluție apoasă 1% (roz-cărămiziu), roșu Congo (virează în albastrui în prezența acizilor) în soluție apoasă 0,5%, fuxina acidă 1/200 în apă acetifiată 1%, ponceau R în soluție apoasă 1% cu 1 ml acid acetic, verde lumină în soluție apoasă 20,35 g% sau în soluție alcoolică 0,82%.

1. Punerea în evidență a mitocondriilor

Fixatorii recomandați sunt amestecurile: Benoît, Flemming, Regaud, Helly.

Tehnica Benoît

- a. Fixare în amestecul Benoît.....24-48 ore.
- b. Spălare în apă curgătoare.....24 ore.
- c. Postfixare în formol 10%.....24 ore.
- d. Spălare în apă curgătoare.....24 ore.
- e. Secțiunile de 2-3 microni, deparafinate, hidratate, sunt colorate la cald cu fuxina Altman.....5 min.
 - fuxină acidă.....6g.
 - apă anilinată saturată...100 ml.
- f. Spălare energetică și rapidă în apă distilată.
- g. Diferențiere sub microscop cu o soluție saturată de acid picric în alcool 96°.
- h. Oprirea diferențierii printr-o spălare rapidă în alcool etilic 70°.
- i. Colorarea cu o soluție apoasă de verde lumină 0,1-0,2%.....3-5 min.
- j. Deshidratare directă în alcool absolut.
- k. Clarificare, montare în balsam de Canada.

Rezultate: mitocondriile apar colorate în roșu, citoplasma și nucleii în verde, lipidele osmiofile în negru. Cu această tehnică se evidențiază microvilii și cilii vibraționali din rinichi, intestin, trahee.

Rezultate bune se mai obțin prin utilizarea metodelor: Benda, Nasonov, impregnații argente.

2. Punerea în evidență a complexului Golgi. Tehnica Cajal-DaFano

- a. Fixare în amestecul preparat extemporaneu 3-24 ore.
 - nitrat de cobalt.....1g.
 - formol 40%.....15g.
 - apă distilată.....100 ml.

- b. Spălare rapidă în apă distilată.
- c. Împregnare în soluția NO_3Ag 1,5% la întuneric.....24-48 ore.
- d. Spălare rapidă în apă distilată.
- e. Reducere în amestecul.....8-24 ore.
 - hidrochinonă.....2g.
 - formol neutru 40%.....15 ml.
 - apă distilată.....85 ml.
 - sulfat de Na anhidru.....0,1-0,5 g.
- f. Spălare rapidă în apă distilată.
- g. Deshidratare, clarificare, includere la parafină.
- h. Secțiunile pot fi virate în Cl_2Au 1%.....10-20 sec. și fixate în tiosulfat de Na 1%.....30 sec.
- i. Spălarea în apă curentă.....2-5 min.
- j. Supracolorare cu violet de crezil 1%.....1 min.
- k. Diferențiere în alcool 90° până la violet palid.
- l. Deshidratare, clarificare, montare în balsam de Canada.

Rezultate: complexul Golgi apare sub forma unor filamente în rețea colorate în negru; fără supracolorare, citoplasma are o tentă aurie. Se obțin rezultate bune cu metoda Mann-Kopsch (cu tetraoxid de osmiu 1%), tehnica lui Elftman (cu azotat de argint).

3. Punerea în evidență a R.E.G

Toate tehnicile se bazează pe bazofilia acidului ribonucleic, constituintul caracteristic al acestui organit. Cele mai bune rezultate se obțin prin detectarea histochimică.

- a. Fixare fragmente scoarță cerebrală în formol 10%.....24 ore.
- b. Spălare apă curgătoare.....12-24ore.
- c. Deshidratare, clarificare, includere la parafină.
- d. Secțiuni de 4-5 microni, deparafinate și hidratate.
- e. Colorare cu soluție apoasă de albastru de toluidină 10%.....10 min.
- f. Spălare în apă distilată + 1 picătură dintr-o soluție suprasaturată de carbonat de litiu.....5-10 sec.
- g. Spălare în apă distilată.....2 min.
- h. Diferențiere pe stativ cu alcool etilic absolut 100 ml + 1 ml acid acetic + 1 pic. amoniac (până la obținerea unei tente bleu-albastru).
- i. Oprirea diferențierii cu alcool etilic absolut, evitându-se decolorarea preparatului.
- j. Clarificare, montare în balsam Canada.

Rezultate: corpusculii Nissl se colorează în bleu închis, citoplasma

în bleu deschis. Corpusculii Nissl mai pot fi evidențiați cu soluție apoasă 1 % de thionină.

4. *Punerea în evidență a centrosomului. Colorația Flemming (variantea Matthey).*

- a. Fixare în amestecul Flemming.....24 ore.
- b. Spălare în apă curentă până la dispariția tentei galbene.
- c. Deshidratare, clarificare, includere la parafină.
- d. Secțiuni de 5-10 microni, deparafinate, hidratate.
- e. Colorarea cu soluție hidro-alcoolică de safranină.....2,1/2 ore.
 - safranină.....1g.
 - alcool etilic absolut.....100ml.
 - apă distilată.....50ml.
- f. Spălarea în 3 băi de apă distilată.
- g. Tratarea cu soluția.....5min.
 - iodură de k.....2g.
 - alcool etilic 70⁰-80⁰.....300ml.
 - iod.....1g.
- h. Spălarea rapidă în apă distilată.
- i. Colorarea cu soluția apoasă 1 % violet. cristal.....15min.
- j. Spălarea în apă distilată.
- k. Tratarea cu soluție iodurată alcoolică timp de20sec.
- i. Deshidratare în 2 băi cu alcool etilic absolut.....10sec. fiecare.
- m. Diferențiere în esență de cuișoare saturată cu orange G.
- n. Eliminarea excesului de diferențiator prin xilol, montare în balsam de Canada.

Rezultate: citoplasma are o tentă galben-brună, diferențierele fibrilare, centrosomul se colorează în brun închis.

Se mai utilizează cu bune rezultate metoda Hortega (impregnare cu argint amoniacal).

3.1.5. *Colorațiile vitale*

3.1.5.1 *Considerații generale*

Colorația vitală reprezintă o metodă a cărei semnificație teoretică și practică depășește simpla punere în evidență a unor detalii de structură la nivelul țesuturilor sau celulelor.

Importanța acestei metode de studiu s-a impus încă de la primele încercări sistematice și un număr mare de discipline biologice beneficiază

astăzi de rezultatele ei.

Punctul de plecare al acestei metode a fost punerea în evidență a anumitor țesuturi, celule sau anumitor organite, evidențiere obținută prin administrarea la un animal viu, a unor coloranți bine aleși. Acest stadiu este depășit însă de mult. În prezent, anumite colorații vitale sunt utilizate în scop pur morfologic dar interesul principal al metodei rezidă în explorarea permeabilității tisulare și celulare, în analiza fenomenelor ce se derulează în timpul absorbției, transportului de substanțe în organism, a acumulării și eliminării substanțelor introduse în mediul intern în scop experimental.

O colorație vitală este în realitate o experiență de fiziologie celulară iar fiecare timp trebuie să fie atent supravegheat.

Colorațiile vitale nu sunt metode de rutină, ele reprezintă metode de cercetare și un procedeu de diagnostic.

În ceea ce privește definiția acestei metode, deși un număr mare de publicații și cercetări au încercat să dea o definiție satisfăcătoare colorației vitale, nu s-a ajuns încă la un acord în acest sens.

Astfel Fischel (1910) propune desemnarea cu numele de colorații vitale, metodele ce permit obținerea unei colorații a anumitor elemente citologice fără a sacrifica în prealabil animalul folosit ca material biologic de studiu.

Pentru Möllendorff (1920, 1926) acest termen de colorație vitală este rezervat colorațiilor obținute în timpul vieții animalului; în spiritul acestei definiții, colorațiile vitale sunt opusul colorațiilor supravitale sau postvitale, executate pe țesuturile unui organism ce tocmai a fost sacrificat ca și în cazul colorațiilor țesuturilor fixate.

Vonwiller și apoi Gicklhorn încearcă definirea acestei metode, insistând asupra imposibilității trasării unei limite rigide între colorațiile vitale și postmortem printr-o definiție riguroasă și absolută.

În general deci, se folosește termenul de colorație vitală pentru toate colorațiile executate pe elemente vii, obținute administrând colorantul la animalul de experiență în întregime, iar cel de colorație post-vitală pentru colorația aplicată țesuturilor sau celulelor extrase din organismul viu deși, se pare că această separare nu este justificată, cunoscut fiind faptul că viața celulelor nu încetează obligatoriu și imediat ce sunt extrase din organism și că ea poate continua un timp în condiții de mediu favorabile iar colorarea anumitor structuri obținute în condiții "vitale" pot reprezenta, la nivel celular, un fenomen post-mortem.

Numărul coloranților este mare, tehnica variind în funcție de colorant și animalul de experiență. De exemplu, pentru studiul celulei în general se

folosesc colorațiile vitale cu roșu neutru, verde Janus, albastru de metilen. Interpretarea colorațiilor vitale și explicarea mecanismelor de acțiune ale acestora sunt probleme cu grad sporit de dificultate. Problemele de ordin fizico-chimic pe care le pune colorația vitală a celulelor și organitelor sunt departe de a fi soluționate. Ar fi iluzoriu să considerăm, în momentul de față, având în vedere stadiul actual al cunoștințelor din acest domeniu, că se poate forma o teorie unică ce ar permite interpretarea colorației tuturor structurilor de către toți coloranții vitali.

Este sigur însă că mecanismele ce intervin în fenomenul global al colorării în vivo, al diverselor structuri, sunt numeroase și variate.

3.1.5.2. Clasificarea coloranților vitali

În mod clasic se disting coloranți vitali acizi și bazici dar această clasificare nu include și substanțele din familia Sudan care pot fi considerate coloranți vitali ai lipidelor întrucât administrarea lor prin ingestie sau prin injectare permite obținerea colorării tuturor incluziunilor lipidice a căror punct de topire este inferior temperaturii corpului.

Deci în afara acestor compuși, în general grupați în categoria "alți coloranți", principalii coloranți vitali pot fi clasificați în:

1. *coloranți acizi*: alizarina, roșul Congo, albastru pirol, albastru tripan, cerneală de China, carminatul de amoniu, nu sunt coloranți în sensul propriu al cuvântului dar sunt incluși în această categorie deoarece ei sunt utilizați pentru evidențierea elementelor histiocitare.

2. *coloranți bazici*: albastru de metilen, albastru de toluidină și azurul de metilen ce sunt tiozine, roșu neutru și verde Janus ce sunt azine, violetul de cresil, albastru de Nil, - oxazine, etc.

3.1.5.3. Etapele colorației vitale

Lui Möllendorff îi revine meritul de a fi insistat primul asupra importanței pe care o reprezintă studiul colorațiilor vitale în funcție de timp. Acest autor definește trei stadii succesive ale unei colorații vitale: absorbția, repartiția intracelulară și acumularea selectivă a colorantului.

Este vorba de trei fenomene a căror delimitare nu este absolută; fiecare având reguli diferite de definiție fiind condiționat de factori diferiți. De aici și interesul major pentru delimitarea acestor trei stadii în momentul descrierii colorațiilor vitale.

Într-o lucrare a lui Gicklhorn sunt analizate aceste trei stadii ale unei

colorații vitale, evidențiindu-se faptul că pătrunderea unui colorant vital în interiorul celulelor depinde de permeabilitatea normală sau modificată a plasmalemei avute în vedere ca și de capacitatea celulei de a fixa colorantul respectiv. Repartiția colorantului în interiorul organismului viu face să apară problema specificității la nivel celular, tisular sau al întregului organism.

În ceea ce privește acumularea colorantului, aceasta depinde de structura și compoziția chimică a celulelor și țesuturilor. Acumularea colorantului vital sub formă granulară reprezintă modalitatea cea mai frecventă. Această acumulare se face în mod diferit în cazul coloranților bazici față de coloranții acizi.

Coloranții bazici se acumulează înainte de toate la nivelul formațiunilor preexistente, adică organite celulare sau paraplasma.

Dimpotrivă, coloranții acizi se acumulează în granule sau vacuole care se formează în momentul acestei acumulări. Această regulă formulată de Mollendorff este valabilă și astăzi în linii mari. În ceea ce privește mecanismul acumulării este vorba, după opinia aceluiași cercetător de o floculație, intervenind și unele fenomene electrostatice.

3.1.5.4. Particularitățile fizico-chimice ale soluțiilor coloranților vitali

Cercetările efectuate de Mollendorff au arătat că formula de structură a colorantului vital ar avea mult mai puțină importanță decât particularitățile fizico-chimice ale soluției utilizate. Această concluzie este valabilă mai ales în cazul colorației vitale în care se folosesc coloranți acizi.

Natura chimică a colorantului utilizat nu reprezintă decât unul din factorii din ansamblul celor ce determină proprietățile soluției administrate animalului de experiență. Mărimea particulelor, încărcarea lor electrică, pH-ul, presiunea osmotică, vâscozitatea, constanta dielectrică a mediului, prezența coloizilor și altor factori, intervin în mod esențial în determinarea caracterelor fizico-chimice a acestor soluții iar rezultatul colorației vitale depinde în mare măsură de acestea.

Este deci necesară întotdeauna, ca odată cu prezentarea rezultatelor unor colorații vitale să fie precizate și caracterele fizico-chimice ale soluțiilor utilizate în cursul experiențelor.

3.1.5.5. Reguli generale de aplicare ale coloranților vitali

Modul de aplicare al coloranților vitali variază într-o mare măsură în funcție de structurile ce se doresc a fi evidențiate și de funcția pe care se dorește a o explora.

1. Folosirea coloranților acizi

Anumiți coloranți acizi pot fi administrați pe cale orală așa cum este albastrul de tripan. Rezultatele nu sunt totuși satisfăcătoare decât la unele nevertebrate.

Injectarea colorantului în mediu intern al animalului de experiență rămâne metoda cea mai indicată. La vertebrate, această injectare poate fi făcută subcutanat, intraperitoneal sau intravenos.

Se observă în acest caz, colorații "locale" sau "de vecinătate" (țesut conjunctiv vecin locului de injectare subcutanat, epiplon în caz de injectare intraperitoneală, elemente histiocitare ale ficatului, splinei, măduvei osoase în caz de injectare intravenoasă). Acumularea electivă a colorantului în anumite țesuturi sau organe este precedată de prezența difuză în tot organismul animalului de experiență.

Viteza de apariție a colorării unui organ dat depinde de calea de administrare; administrarea intravenoasă duce la repartizarea cea mai omogenă a colorantului în corpul animalului de experiență și la acumularea cea mai rapidă în organe.

Inconvenientul major al acestei căi de administrare constă în toxicitatea majorității soluțiilor coloranților vitali, toxicitate ce imprimă o reducere sensibilă a dozei ce va fi administrată pe cale intravenoasă. Soluțiile trebuie preparate proaspăt deoarece marea majoritate a soluțiilor de coloranți vitali capătă pe măsura trecerii timpului (chiar în cazul conservării în condiții aseptice și la temperaturi scăzute) o toxicitate a cărei origine este încă necunoscută.

Examinarea țesuturilor și celulelor colorate prin intermediul unui colorant vital acid poate fi făcută în stare proaspătă sau după o fixare.

Contrar coloranților bazici, acumularea coloranților vitali acizi poate fi conservată prin folosirea unei serii de agenți fixatori chimici, aceasta putând duce la erori de interpretare. De aceea modalitatea ideală este de a examina in vivo și in situ celulele sau țesuturile ce conțin acumulări de coloranți acizi.

Acest lucru este ușor de realizat pentru unele țesuturi și organe (mezenter, plămân, cornee), posibil în alte situații (ex. rinichi de soarece) și imposibil de realizat în majoritatea cazurilor, astfel încât realizarea secțiunilor la congelare și de material proaspăt este de maximă importanță pentru examinarea rezultatelor coloranților vitali.

Alegerea fixatorului, prelucrarea ulterioară a pieselor și alegerea coloranților de fond depinde de colorantul vital utilizat și de țesut.

2. Folosirea coloranților bazici. Condițiile de aplicare și mai ales

tehnica examinării sunt particulare în cazul coloranților vitali bazici. Conservarea prin fixatori chimici este imposibilă în majoritatea cazurilor și de aceea este necesară urmărirea in vivo a tuturor fazelor colorației.

Anumiți coloranți, ex: verdele Janus, nu sunt utilizați decât pentru aplicări locale; alții, ca roșu neutru sau albastru de metilen pot fi aplicați local sau injectați în mediul intern al animalului de experiență. Modalitățile și precauțiile de preparare semnalată pentru coloranții vitali acizi sunt valabile și în cazul coloranților bazici.

3.1.5.6. Colorare vitală a mitocondriilor — *pară*.

- a. Se face o soluție apoasă de albastru de metilen 1%.
- b. Se încălzește la temperatura corpului.
- c. Se injectează în vena cozii la soarece 0,5 - 1 ml. din soluția 1% de albastru de metilen la temperatura de 25°-27°C.
- d. După 24 ore se sacrifică animalul și fragmentele de rinichi se fixează 4-6 ore în amestecul:
 - soluție apoasă saturată acid picric.....60ml.
 - formol 40%.....20ml.
 - soluție apoasă saturată molibdat amoniu.....20ml.
- e. Spălare în apă curgătoare.....12-24ore.
- f. Deshidratare, clarificare, includere la parafină.
- g. Secțiunile de 3-5 microni deparafinate și hidratate se colorează cu safranină pentru nucleii.
- h. Spălare în apă distilată.
- i. Deshidratare, clarificare, montare în balsam de Canada.

Rezultate: glomerulii apar incolori iar mitocondriile din nefrocite se colorează în albastru.

IV. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA ELECTRONICĂ.

Biologia celulară și moleculară, ca știință de sine stătătoare, a luat naștere în urmă cu aproximativ 50 de ani ca urmare a utilizării complexe a trei metodologii:

- microscopia electronică;
- fracționarea celulară;
- culturile de celule;

Dintre acestea, microscopia electronică domina perioada contemporană a microscopiei deoarece este singura metodologie care poate furniza informații directe asupra organizării lumii vii în domeniul dimensiunilor de 1,2 Å-2000 Å, care scapă posibilității de studiu cu microscopul fonic.

4.1. TIPURI DE INFORMAȚII CARE SE POT OBTINE PRIN MICROSCOPIE ELECTRONICĂ

- gradul de înrudire genetică dintre organisme;
- biosinteza de proteine și structurile implicate în acest proces;
- structura și configurația macromoleculelor proteice;
- configurația moleculară a acizilor nucleici și stabilirea greutateii lor moleculare;
- procese de filtrare prin membrană;
- transportul ionic în celule;
- localizarea reacțiilor imunologice și a activității enzimatic;
- acțiunea unor substanțe asupra structurilor celulare (ex: chimioterapice, pesticide, etc.);
- structura supfețelor țesuturilor, celulelor și biomoleculelor;
- alcătuirea moleculară a virusurilor și mecanismele infecției virale;
- procese de transcripție și translație în codul genetic;
- ultrastructura diferitelor tipuri de celule și a componentelor acestora în stare normală și patologică, etc.

4.2. PRELEVAREA PROBELOR

Pentru a preveni schimbările de orice natură care pot apare la nivel tisular sau celular chiar din momentul prelevării, recoltarea trebuie să se facă

rapid (la câteva minute de la întreruperea circulației sanguine, apar modificări semnificative în ultrastructura complexului Golgi, mitocondriei și reticulului endoplasmic). Este necesar să se ia în considerare și particularitățile tipului de organism, organ sau țesut supus studiului, chiar dacă în unele cazuri anumiți parametri funcționali ai țesuturilor nu sunt influențați sau chiar dacă alterarea se produce în ritm lent.

Condiția esențială obținerii unor rezultate corecte este ca probele de material biologic să fie prelevate numai din organisme vii care nu au suferit acțiunea unor factori stresanți sau din culturi celulare proaspete și direct din mediul în care au crescut. Bune rezultate se obțin când concomitent cu prelevarea pieselor de țesut se realizează și o prefixare a materialului respectiv.

1. Fragmentele de material biologic obținute prin puncții sau biopsii, sau fragmentele mici din țesuturile și organele recoltate imediat după sacrificarea animalului de experiență sunt puse pe fața fără emulsie da azotat de argint a unei hârtii fotografice.

2. Peste aceste fragmente se pun 2-3 picături din lichidul fixator ($+4^{\circ}\text{C}$) pentru a opri pe cât posibil acțiunea distructivă a enzimelor celulare.

3. Cu ajutorul a două lame de ras noi, bine degresate, prin mișcări de translație se confecționează cubulețe cu latura de 1mm.

4. Cu o scobitoare se ridică fragmentele și se introduc într-un flacon cu fixator răcit la $+4^{\circ}\text{C}$. Sângele se recoltează pe anticoagulant (acid citric și dextroză).

4.3. FIXAREA

Fixarea în microscopia electronică ca și în cea fonică are drept scop conservarea structurilor biologice cât mai aproape de starea lor funcțională vie. De asemeni, prin fixare, celulele capătă un oarecare grad de rezistență împotriva eventualelor distrugerii ce pot surveni în cursul operațiunilor ulterioare. Tipul de fixator, procedeul folosit la fixare și durata diferitelor etape ale procesului de fixare depind nu numai de materialul biologic ci și de scopul urmărit în cadrul studiului întreprins.

Pentru fixare se folosesc:

1. *Metode fizice* - au la bază folosirea temperaturilor foarte scăzute, cu sau fără infiltrarea prealabilă a țesuturilor cu agenți de crioprotecție, pentru a preveni formarea cristalelor de gheață ce ar putea deteriora structurile biologice. În ultimii ani se folosesc: deshidratarea inertă și metoda de substituție prin înghețare.

2. *Metode chimice* - folosesc proprietățile fixatoare ale unor reactivi care blochează rapid metabolismul celular, inclusiv activitățile enzimatice.

Soluția fixatoare este formată din: a) soluția tampon; b) agentul fixator

a) soluțiile tampon au rolul de a asigura molaritatea necesară diferitelor formule de fixare și de a crea mediul de reacție adecvat acțiunii acestora asupra materialului biologic. Se folosesc și în diferite studii de ultracitochimie.

Dintre soluțiile tampon mai folosite sunt:

- tampon cacodilat (compatibil cu toți agenții fixatori)
- tampon fosfat (compatibil cu toți agenții fixatori, incompatibil cu ioni de calciu și uranil)
- tampon veronal (utilizat de Palade în 1952 pentru a tampona OsO_4 , este incompatibil cu aldehyde fixatoare)

b) agenții fixatori: **anorganici** (oxizi - OsO_4 , săruri-permanganat de potasiu și bicromatul de potasiu); **organici** (aldehyde-formaldehydele, glutaraldehida, acroleina, acizi-acidul tanic și unele catechine).

Aldehydele sunt foarte buni fixatori realizând o excelentă conservare a structurilor celulare și a activității enzimatice; sunt folosite ca prefixatori la aproape toate categoriile de țesuturi, acțiunea lor fixatoare bazându-se pe procese reducătoare. Fixarea poate fi simplă, dublă (doi fixatori aplicați în etape succesive), triplă, combinată (acțiunea simultană a amestecului de doi sau mai mulți fixatori prin reacții concomitente de reducere și oxidare asupra țesutului).

În practica curentă se folosește o **dublă fixare**:

- **prefixare** cu glutaraldehydă tamponată;
- **postfixare** cu tetraoxid de osmiu tamponat;

Se utilizează trei procedee de fixare:

a) Fixarea prin imersie- fragmentele recoltate se introduc în flaconul cu fixator aflat într-un vas cu gheață (fixare postvitală)

b) Fixarea prin sedimentare- se realizează în tuburi de centrifugă, în cazul preparatelor care necesită sedimentar pe parcursul lucrărilor; suspensiile conțin material biologic ce sedimentează, supernatantul se aruncă iar peste depozit se pun câțiva ml de fixator, se agită energic, apoi după expirarea timpului de fixare, soluția fixatoare se înlătură prin centrifugare și sedimentul este prelucrat în continuare.

c) Fixarea prin perfuzie- se realizează prin introducerea lichidului fixator în torrentul circulator, înaintea sacrificării animalului de experiență.

Tehnica de lucru.

Fragmentele prelevate și fasonate sunt introduse cu ajutorul unei scobitori într-un flaconaș în care se găsește glutaraldehidă tamponată ($+4^{\circ}\text{C}$) în care vor sta 1 oră la frigider; flaconul se acoperă cu un dop (glutaraldehida este toxică) pe care se notează numărul de ordine din registrul de evidență.

În laboratorul nostru utilizăm fixatorul 251 format din:

- glutaraldehidă distilată 10%.....2 părți
- tampon fosfat 0,1 M.....5 părți
- apă bidistilată.....1 parte

Fixatorul se varsă într-o sticlă cu dop rodat iar fragmentele rămase pe pereții flaconului se spală de trei ori a câte 1 oră cu tampon fosfat 0,15 M la temperatura de 4°C .

După a treia spălare fragmentele sunt post-fixate în același flacon cu fixatorul Milloning timp de 1 oră și la $+4^{\circ}\text{C}$.

- tetraoxidul de osmiu.....1g
- tampon fosfat, 0,15 M.....100ml

Acest fixator poate fi utilizat 1-2 săptămâni de la data preparării, ținut în sticle brune cu dop rodat (este foarte toxic) și la frigider ($+4^{\circ}\text{C}$).

4.4. SPĂLAREA PIESELOR

Are drept scop oprirea procesului de fixare și îndepărtarea excesului de fixator. Cel mai recomandat procedeu este acela de a spăla țesuturile timp de 5-20 min sau chiar peste noapte cu aceeași soluție tampon care a fost folosită la prepararea fixatorului.

4.5. DESHIDRATAREA PREPARATELOR

Prin deshidratarea preparatelor se urmărește eliminarea apei din țesuturile fixate pe cale chimică sau fizică fără a produce modificări în structura moleculară nativă a celulelor din țesuturi.

Alegerea solventului pentru deshidratare este în funcție de materialul de includere, acesta trebuie să fie miscibil cu agentul de deshidratare. În cazul folosirii vestopalului ca material de includere se folosește acetona iar în cazul eponului alcoolul etilic și propilenoxidul.

4.6. INCLUDEREA

Includerea este etapa în care piesele deshidratate corect se introduc

într-un mediu lichid care, prin polimerizare, trece în stare solidă. Calitățile necesare mediului de includere sunt:

- să fie solubil în agenții de deshidratare;
- să aibă molecula mică și vâscozitate redusă pentru a putea pătrunde ușor în țesuturi;
- să fie transparent pentru a putea permite centrarea piesei și fasonarea blocurilor în vederea secționării;
- să facă masă compactă cu țesutul în urma polimerizării;
- să se polimerizeze ușor, liniar, fără modificări de volum;
- să permită obținerea de blocuri de diferite durități și să se secționeze ușor;
- să aibă stabilitate mecanică la bombardamentul cu electroni (densitate mică, putere mică de împrăștiere a electronilor, asigurând un contrast înalt țesutului pe care îl impregnează);
- să nu prezinte factori de risc, adică să nu fie toxice sau toxicitate limitată.

Cele mai utilizate medii de includere fac parte din grupa rășinilor poliesterice (vestopal) a rășinilor epoxidice (epon 812, epon 562, araldita) și mediile de includere hidrofiele (durcapanul, hidroxipropilmetacrilatul) care prezintă avantajul că evită deshidratarea și conservă lichidele și enzimele din celulă.

Includerea se face în capsule de gelatină sau polietilenă (BEEM).

Capsulele de gelatină trebuie să fie:

- a) transparente pentru a vedea poziția piesei în rășină și pentru a-i da orientarea dorită;
- b) de dimensiuni potrivite, pentru a permite o polimerizare ușoară a monomerilor;
- c) bine uscate, ceea ce se realizează prin ținerea lor înainte de a fi umplute cu rășină în termostat la 60°C pentru câteva ore.

Capsulele de polietilenă se folosesc la includerea structurilor biologice aflate în depozite după centrifugare (virusuri, microorganisme, fracțiuni celulare) sau chiar a structurilor compacte. Blocurile solidificate obținute în aceste capsule sunt gata fasonate pentru secționare.

Capsulele de gelatină se așează în poziție verticală în suporturi de plastic sau carton; pe marginea lor se introduce cu o pipetă o picătură de epon sau vestopal de lucru, avitându-se formarea bulelor de aer. Cu ajutorul unei scobitori în fiecare capsulă se plasează un singur cubuleț de țesut sau organ care se așează central; se introduce eticheta cu numărul cazului, se umple capsula cu epon sau vestopal de lucru și se lasă sub nișă până a doua

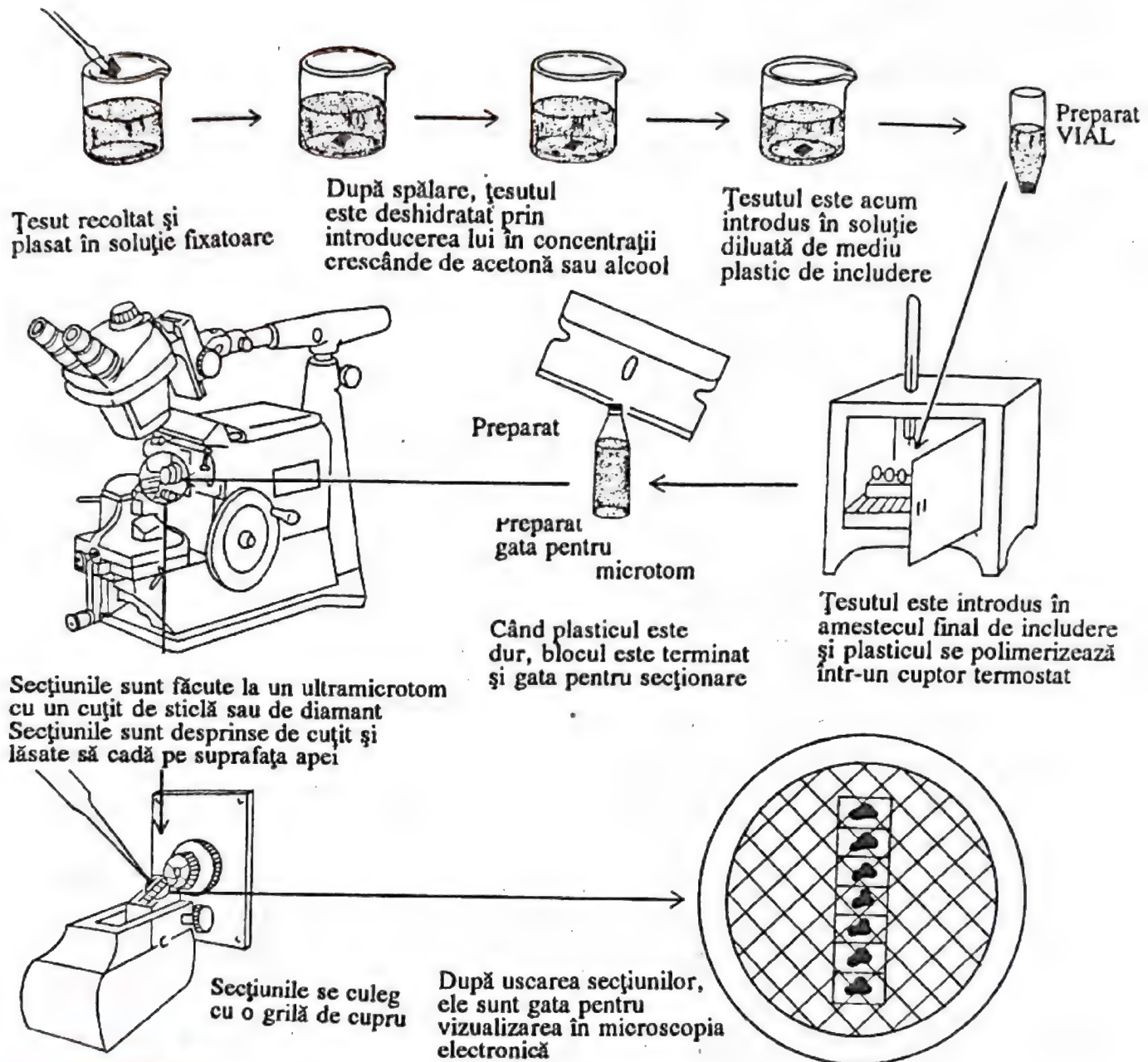


Fig.24. Reprezentarea schematică a derulării etapelor de prelucrare a materialelor biologice în vederea examenului lor la TEM.

zi dimineată.

Suportul cu capsule este introdus apoi într-un termostat la 60°C unde, în 24-48 ore se face polimerizarea materialului de includere. La sfârșitul polimerizării blocul trebuie să fie transparent, suficient de dur și să conțină în vârful său piesa care este de culoare neagră.

Tehnica includerii în Epon 812

În compoziția mediului de includere intră următoarele substanțe:

Amestecul A + Amestecul B + Accelerator DMP - 30

✱ Epon 812 +DDSA	Epon 812+MNA	
5 ml	5 ml	0,15 ml

DDSA = anhidrida dodecenil - succinică

MNA = anhidrida metilanadică

Acest amestec de 5 : 5 folosit în laboratorul nostru permite obținerea de blocuri ușor secționabile cu un cuțit de sticlă. Amestecul 3 : 7 se secționează bine cu un cuțit de diamant. Acest amestec fiind solubil în etanol, oxid de propilen deshidratarea se poate face în etanol cu sau fără intercalarea unor băi de oxid de propilen.

Procedeul ce trebuie urmat este următorul:

1. Fixarea în G.A.tamponată
2. Spălarea în tampon fosfat
3. Postfixare în O_3 tamponat
4. Spălare în tampon fosfat
5. Deshidratare:

alcool 30%.....	10min.
alcool 50%.....	10min.
alcool 70%.....	10min.
alcool 90%.....	10min.
alcool 100% (2 băi)	20 min. fiecare
acetona 100% (2 băi)	20 min. fiecare

(această ultimă etapă nu este obligatorie, dar se recomandă pentru o mai bună impregnare)

6. Impregnare

acetona 100% + epon de lucru 1/1	1 oră
epon de lucru	1 oră

7. Includere: piesele din materialul biologic se introduc în capsule de gelatină în eponul de lucru, în nișă, la temperatura laboratorului.

8. Polimerizarea eponului la termostat, la 60°C.

Țesuturile se pun în capsule de gelatină cu amestec de Epon proaspăt preparat. Se lasă până când piesele cad la fundul capsulelor și apoi polimerizarea are loc la 60°C peste noapte.

4.7. SECȚIONAREA

Preparatele boilogice fixate și incluse în diferite medii de includere sunt supuse unor operații de secționare prin tehnici speciale, cu ajutorul unor aparate speciale numite ultramicrotoame, pentru a realiza secțiuni ultrafine, a căror grosime nu depășește 1000 Å și care vor fi ușor traversate de fasciculul de electroni.

Apărută după 1948, ultramicrotomia se dezvoltă în paralel cu celelalte tehnici de microscopie electronică și constituie un domeniu aparte, cu o aparatură și o metodologie proprie.

Tehnicile de ultramicrotomie se caracterizează printr-o mare finețe cu ajutorul lor putându-se realiza 20-30 secțiuni ce nu sunt vizibile cu ochiul liber, printr-o celulă cu diametrul de 1 μm, de exemplu o bacterie.

4.7.1. Tipuri de ultramicrotoame

În prezent există două tipuri de ultramicrotoame ce se deosebesc prin principiul folosit la înaintarea preparatului către cuțit în timpul procesului de secționare. Se cunosc astfel: microtoame cu avans mecanic și microtoame care funcționează pe principiul avansului prin expansiune termică.

Din punct de vedere al construcției, orice microtom este alcătuit dintr-un bloc metalic pe care sunt fixate tija de care se fixează preparatul și mecanismul de avans al acesteia, suportul pentru cuțit, microscopul stereoscopic necesar observării proceselor secționării și reglării aparatului și sistemul de iluminare. Acestea alcătuiesc ultramicrotomul propriu-zis. Separat se află blocul electronic de control. Ultramicrotomul și blocul electronic de control sunt fixate pe o masă proprie, prevăzută cu sisteme de prevenire și amortizare a vibrațiilor.

a) Ultramicrotoamele cu expansiune mecanică.

- cu mod de operare manual (Sorvall Porter-Blum Mt1, Cambridge - Huxley) se aseamănă cu microtoamele clasice, avansul preparatului către cuțit făcându-se prin intermediul unor roți dințate în urma rotirii cu mâna a unei roți de avans prevăzută cu manivelă.

b) Microtoamele cu expansiune termică.

- cu mod de operare manual, semiautomat și automat (L. K. B., Reichert O_mU₃) funcționează pe baza principiului de dilatare termică. Tija metalică (care servește drept suport pentru blocul ce trebuie secționat) fixată cu una din extremități de un cadru, are înfășurată pe ea o bobină; la trecerea unui curent electric de intensitate variabilă, tija metalică se încălzește, se dilată și transmite dilatarea ei numai la extremitatea liberă, determinând înaintarea către cuțit a preparatului. Concomitent cu deplasarea orizontală, tija descrie și o mișcare în plan vertical de sus în jos.

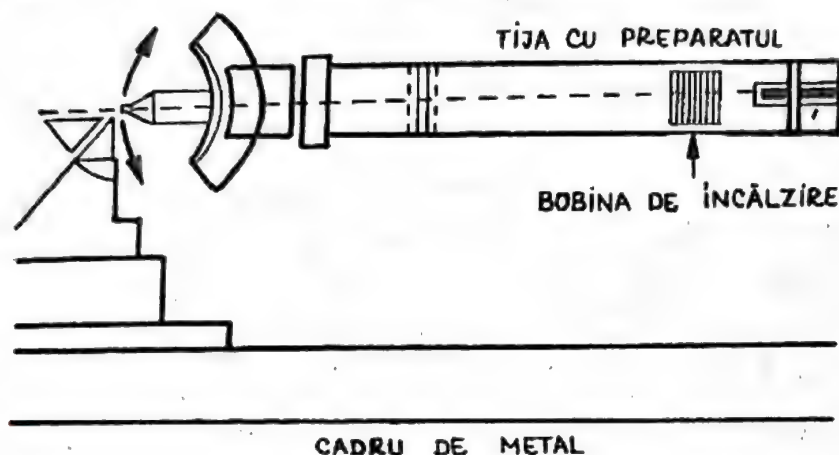


Fig.25. Dispozitivul de secționare al ultramicrotoamelor cu expansiune termică.

4.7.2. Cuțite pentru ultramicrotoame

În perioada de început a ultramicrotomiei pentru a realiza secțiuni ultrafine s-au folosit cuțite de oțel, fiind adaptate în acest scop lame de ras; pentru ca acestea să corespundă exigențelor unui cuțit de ultramicrotom, primele ultramicrotoame erau înzestrate și cu dispozitive de ascuțire a lamelor.

a) Cuțitele de sticlă - au fost introduse pentru prima dată în 1950 în urma cercetărilor lui Latta și Hartman (1950).

Calitatea sticlei este de asemenea importantă; sticla cu grosimea de 5-8 mm, folosită la confecționarea oglinzilor de culoare albă și nu verzuie, atunci când este tăiată în benzi și care este lipsită de tensiuni interne pare să fie cea mai bună. Există și sticlă specială trasă în benzi pentru ultramicrotoame produsă de o firmă belgiană de unde este procurată de firma suedeză LKB și livrată odată cu ultramicrotoamele LKB.

Confecționarea cuțitelor se poate face fie manual, fie cu ajutorul unui aparat special (ex: aparatul Reichert - TAAB Knife Maker).

Cuțitele confecționate manual sau cu ajutorul aparatului trebuie

selecționate după calitatea lor. Alegerea se face cu ochiul liber și la microscop, tăișul cuțitului trebuie să fie drept.

Operației de confecționare a cuțitelor și de selectare a acestora trebuie să i se acorde cea mai mare importanță, deoarece cuțitele cu defecte vor imprima secțiunilor neregularități, nepermițând obținerea de secțiuni sub formă de panglică.

Cuțitele se păstrează în cutii speciale, în poziție verticală sau în plăci Petri pe un pat de vată, pentru a le feri de praf. Înainte de folosire, la cuțit se atașează o mică băiță pentru colectarea secțiunilor pe suprafața apei. În acest scop se pot folosi băițe de metal, gata confecționate (ex: cele furnizate de LKB) sau pot fi confecționate în laborator.

b) Cuțitele de diamant - au fost introduse în 1953. Ele pot fi folosite o perioadă lungă de timp și dau posibilitatea secționării materialelor de cele mai diferite durități.

Se cunosc două tipuri de cuțite de diamant: standard și special. Tipurile standard se folosesc la secționarea materialelor incluse în metacrilati, Vestopal, iar tipul special la secționarea materialelor incluse în rășini epoxidice.

Tăișul cuțitelor de diamant este casant, se poate ușor contamina cu particule din aer sau coroda în contact cu umiditatea, de aceea ele trebuie păstrate în cutia originală, ferite de praf.

4.7.3. Fasonarea blocurilor

Înainte de a le supune procesului de secționare, blocurile cu preparate biologice trebuie fasonate.

Prin această operație o anumită zonă din preparat capătă aspect de piramidă. Dacă la includere s-au folosit capsule de polietilenă, atunci blocul apare aproape gata fasonat în această formă.

Operația de fasonare a blocurilor se face manual după îndepărtarea capsulei de gelatină, sub o lupă binoculară, cu ajutorul unei lame de ras noi, după fixarea blocului într-un portbloc.

Se confecționează un trunchi de piramidă, al cărui vârf trunchiat ce conține piesa, trebuie să aibă forma unui pătrat cu latura de 0,1-0,2 mm.

Fasonarea blocului se poate face cu ajutorul ultramicrotomului și cu cuțite de sticlă.

O metodă simplă a fost preconizată în acest scop de Galley (1963) fiind eliminate pierderile de țesut care pot apărea la fasonarea manuală.

Există și aparate speciale pentru fasonarea blocurilor numite

piramitoame asemănătoare microtoamelor clasice (ex: piramitomul LKB1 1800 și piramitomul Reichert TM 60). Ambele instrumente realizează în 1-2 minute piramide de calitate, prin numai 4 secțiuni.

Indiferent de metoda de fasonare, piramida trebuie să fie foarte mică, să aibă laturile netede, deoarece numai din blocurile astfel fasonate se poate obține o panglică de secțiuni.

4.7.4. *Secționarea propriu-zisă și colectarea secțiunilor*

Înainte de secționării propriu-zise, port-preparatul se fixează în partea terminală a tijei de avans iar cuțitul se montează în suportul său și, folosind sistemele de ghidare, se urmărește ca fața cuțitului care "privește" spre preparat să fie alipită de ghidajul perpendicular al cuțitului.

- Cuțitul se orientează astfel încât tăișul lui să fie paralel cu suprafața preparatului iar suportul cu preparatul se rotește încât laturile care delimitează pătratul sau trapezul să fie perpendiculare pe gura cuțitului iar baza mare a trapezului să fie paralelă cu tăișul acestuia.

Toate aceste reglaje se execută privind prin microscopul stereoscopic.

- Cu ajutorul unei seringi se introduce în băița cuțitului o soluție de acetonă sau alcool 10-15%, în cazul cuțitelor de sticlă sau, apă distilată în cazul cuțitelor de diamant și se urmărește sub microscop până când lichidul atinge tăișul cuțitului. Prin mișcarea lămpii fluorescente înainte și înapoi se urmărește reflexia luminii pe suprafața apei din băiță, reprezentată printr-o pată albă care trebuie să se întindă pe toată lungimea cuțitului.

- Privind prin microscop tăișul cuțitului și piramida din preparat, centrate în același câmp vizual, se aduce cuțitul cu ajutorul vizei macrometrice, foarte aproape de preparat și apoi se trece aparatul pe controlul automat. După o serie de mișcări în gol, preparatul va atinge cuțitul și va începe secționarea.

- Grosimea secțiunilor poate fi reglată electronic de la pupitrul de control în limitele dorite.

Vizual, grosimea secțiunilor se poate aprecia prin reflexia în băiță pe suprafața apei, culoarea secțiunilor în lumină reflectată fiind în funcție de grosimea acestora (Peachey 1958, Zelander și Ekholm 1960).

Culoare	Grosime (Å)
cenușie	sub 600
argintie	600 - 900
aurie	900 - 1500
purpurie	1500 - 1900

albastră	1900 - 2400
verde	2400 - 2800
galbenă	2800 - 3200

Pentru cercetările de rutină secțiunile de culoare argintie se consideră convenabile. Pentru cercetările de microanaliză cu ajutorul dispozitivului EDAX atașat la microscop ca și pentru estimarea densității numerice a ribozomilor în celule, au fost imaginate tehnici noi de determinare a grosimii secțiunilor (Chander 1976; Gunning și Hardham 1977).

Obținerea unor secțiuni ultrafine de bună calitate depinde în primul rând de modul de fasonare al blocului în special de dimensiunile vârfului și forma planului de tăiere, de existența unui cuțit curat, de nivelul apei la gura cuțitului și de unghiul de înclinare al cuțitului.

Mai trebuie avute în vedere alegerea unei viteze de secționare mici și evitarea atingerii preparatului în timpul lucrului.

Secțiunile semifine se fac cu ajutorul ultramicrotomului prin folosirea avansului manual (cu o grosime de 1500-3200 Å) cu scopul de a verifica dacă blocul respectiv conține elementele pe care ni le-am propus să le examinăm.

Secțiunile semifine se culeg din bac cu o ansă de sârmă subțire și se așează pe o lamă portobiect degresată; apa este înlăturată prin încălzirea lamei la flacără care realizează și aderența secțiunilor pe lamă.

După colorare se analizează la microscopul fonic. Pentru colorarea secțiunilor semifine există mai multe metode: colorarea cu albastru de toluidină (Trump și colab. 1961), cu albastru de anilină - albastru de metilen, cu Azur II, cu fuxină bazică - albastru de metilen, etc. Aproape toate aceste metode permit obținerea unui contrast înalt și observarea cu ușurință a detaliilor celulare. Alegerea uneia sau alteia dintre metodele menționate depinde de țesutul ce urmează să fie cercetat, de mediul în care este inclus. În laboratorul nostru se utilizează colorarea cu o soluție de albastru de toluidină 0,1% și soluție carbonat de sodiu 2,5% în părți egale, pH 11.

Colorarea se face aplicând pe lamă 2-3 picături din soluția de albastru de toluidină; lamele se pun în termostat la 60 grade C timp de 10-30 min. apoi se spală în apă curgătoare apoi în acetonă 100%, se trec rapid prin xilol, se sugativează, se montează și se examinează la microscopul fonic.

Secțiunile ultrafine rezultate în urma secționării urmează să fie depuse pe un portobiect care în microscopia electronică este o grilă metalică. În acest scop se oprește aparatul și panglica se fragmentează cu ajutorul unui fir de păr prins de un bețișor. Cel mai indicat pentru această operație este un

fir de păr de geană, care, în urma lipirii pe bețișor, trebuie să aibă liberă partea cu bulbul, de care nu aderă secțiunile. Încercarea de a mișca secțiunile cu alte mijloace, de ex. cu un ac, poate duce la pierderea lor, deoarece acestea se prind foarte ușor de orice material.

Secțiunile se grupează în șiruri paralele pentru a putea fi depuse pe grilă în număr cât mai mare. Dacă dorim reconstituirea tridimensională a structurilor cercetate, atunci secțiunile trebuie să fie colectate bucată cu bucată și numerotate.

4.8. APLICAREA SECȚIUNILOR ULTRAFINE PE GRILE

4.8.1. Grile suport

Preparatele biologice folosite în microscopia electronică fiind extrem de fine, nu au rigiditate mecanică. De aceea ele se plasează pe un portobiect corespunzător. Dacă în microscopia fonică se folosesc ca portobiect lame de sticlă, în microscopia electronică de transmisie portobiectul este o grilă metalică și o peliculă de natură organică sau anorganică ce acoperă suprafața grilei.

La început s-au folosit ca suport pentru preparat discuri sau șaibe de metal confecționate din aliaj de aur sau platină. Apoi acestea au fost înlocuite cu grile metalice obținute prin ștanțare din plase sau rețele de cupru, bronz fosforos sau nichel cu 50-150 ochiuri/cm². După 1950 s-a trecut la folosirea grilelor produse pe cale electrolitică sau prin metode fotolitografice.

În prezent există o gamă variată de suporturi pentru preparate (grile și discuri), confecționate pe cale electrolitică din cupru, nichel, oțel inox, argint, aur, platină, molibden sau tungsten. Grilele electrolitice sunt de mai multe feluri: a) standard; b) de identificare; c) duble.

a) În cazul grilelor standard, criteriul internațional de identificare este **mesh-ul**, adică numărul de ochiuri pe "inch" (2,54 cm). Ca suport pentru secțiunile ultrafine, cele mai bune grile sunt cele de 200 mesh acoperite cu o peliculă organică sau cele de 300 mesh care pot fi utilizate fără peliculă.

Grilele de 75, 100 și cele de 150 mesh se utilizează mai puțin, deoarece au ochiuri foarte mari și pelicula de colodiu sau de formvar cu care sunt acoperite, dacă nu este întărită cu carbon, nu rezistă la bombardamentul cu fasciculul de electroni.

b) Grilele de identificare au marginea solidă și prezintă specificații de referință în interiorul ochiurilor, pentru identificare rapidă în microscop a unei zone de interes din preparat.

c) Grilele duble sunt destinate realizării de preparate sub formă de sandwich și au pe fiecare parte câte un tip de rețea, fiind de fapt două grile suprapuse și legate între ele.

În prezent, ca suport pentru preparat, se folosesc, în afară de grile, discuri metalice cu diametrul de 3 mm, confecționate din cupru sau nichel cu un singur orificiu central rotund sau elipsoidal.

4.8.2. *Pelicle suport*

Pentru ca grilele să devină un bun suport pentru preparat, se acoperă cu pelicle organice sau anorganice fine, transparente la fasciculul de electroni a căror grosime nu trebuie să depășească 200 Å.

Peliclele se obțin în laborator și trebuie să întrunească anumite caracteristici:

- să nu se deterioreze la depunerea preparatului și în timpul colorării sau spălării;
- să fie lipsite de structură proprie în raport cu rezoluția microscopului;
- să aibă grosime uniformă;
- să prezinte aderență mare, deci să fie hidrofile;
- să nu se încarce electric în timpul iradierii cu electroni;
- să fie complet netede pentru a nu permite interferențe la metalizare;
- să fie stabile la vidul înalt din microscop și la bombardamentul cu electroni.

a) Peliclele organice se obțin prin diferite metode, din materiale dizolvate în solvenți organici. De ex. pelicle din: nitrat de celuloză în acetat de amil (soluție de colodiu, zapon - lac sau parlodion), formvar, pioloform, B, polistirol, etc.

b) Peliclele anorganice se folosesc pentru examinarea unor anumite preparate mai ales în cazul cercetărilor ce necesită o înaltă rezoluție. Se folosesc pelicle de: aluminiu, beriliu, monoxid de siliciu sau cuarț ce se obțin prin evaporarea în vid a acestor materiale.

În vederea măririi rezistenței la fluxul de electroni a peliclei, pe suprafața acesteia se depune un strat subțire și uniform de carbon cu ajutorul unui aparat de carbonare sub vid înalt (10^{-5} - 10^{-6} Torr).

Pe grilele pregătite prin una din metodele menționate se depun preparatele biologice. Există o gamă largă de preparate biologice: sub formă de suspensii (molecule, virusuri, fracțiuni celulare, celule libere) secțiuni ultrafine sau replici de pe preparatele biologice, care se pot examina cu

microscoapele electronice de transmisie.

Depunerea suspensiilor pe grile se poate realiza prin 4 metode:

- a) depunerea suspensiei cu ajutorul unei micropipete
- b) depunerea preparatului prin absorbție
- c) depunerea preparatului prin întindere
- d) depunerea preparatului prin pulverizare.

În cazul secțiunilor ultrafine acestea se culeg de pe suprafața apei din bac prin simplul contact al peliculei carbonat de pe grilă; îndepărtarea apei în exces cu ajutorul hârtiei de filtru face ca secțiunile să adere puternic la peliculă.

Grilele cu preparatul în sus se plasează într-o cutie Petri pe fundul căreia se află hârtie de filtru și pe care se notează numărul preparatului din registrul de evidență.

4.8.3. *Contrastarea preparatelor biologice*

Preparatele biologice, fiind alcătuite din atomi cu numărul (Z) mic, au o putere destul de redusă de împrăștiere a electronilor și în consecință, la examinarea cu microscopul electronic apar lipsite total de contrast.

Pentru mărirea contrastului biomoleculelor, al virusurilor, al diferitelor microorganisme și al secțiunilor de țesuturi, se recurge în practică la o serie de metode de contrastare, cele mai utilizate fiind: colorarea pozitivă, colorarea negativă și umbrirea sau metalizarea.

4.8.3.1. Colorarea pozitivă are la bază interacțiunea chimică dintre structurile biologice și un colorant format din săruri ale unor metale grele. Prin colorarea pozitivă se urmărește cuplarea colorantului cu moleculele preparatului biologic. Contrastul trebuie să apară ca urmare a împrăștierii electronilor de cantitatea de colorant pătrunsă în interiorul preparatului. În cercetarea de rutină se practică o dublă colorare cu acetat de uranil și citrat de plumb în soluție.

4.8.3.2. Contrastarea cu acetat de uranil. Un număr de godeuri făcute pe o placă de plexiglas se umplu cu o soluție de acetat de uranil 13%, utilizând o pipetă cu pară de cauciuc.

Fața cu secțiuni ale grilelor se aplică pe suprafața soluției din godeuri lăsându-le în contact 10 min, la întuneric.

Cu ajutorul unei pense foarte fine se iau grilele de pe suprafața picăturilor de acetat de uranil pe care plutesc și se spală trecându-le prin 3

băi cu alcool etilic 50%. Sugativarea alcoolului de pe grilă.

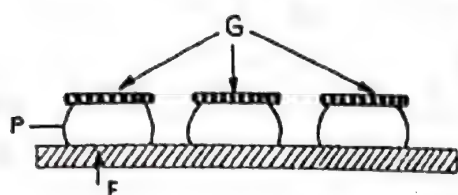


Fig.26. Tehnica contrastării secțiunilor: G- grile; P- picătura de soluție contrastantă; F- suport.

4.8.3.3. Contrastarea cu citrat de plumb (soluția Reynolds) se execută în al doilea timp.

Pe o placă de parafină curată se pune un număr de picături din soluția Reynolds (nitrat de plumb + citrat de sodiu + apă distilată), corespunzător numărului de probe de colorat.

Peste aceste picături se aplică grilele cu preparatul în jos și se țin 3 min după care se spală cu apă distilată.

Excesul de apă se elimină cu o hârtie de filtru după care secțiunile pot fi examinate la microscopul electronic.

4.8.3.4. Colorarea negativă - este una din metodele cu cea mai largă utilizare în microscopia electronică pentru studiul virusurilor, microorganismelor și fracțiunilor celulare. La baza ei stă metoda clasică, cunoscută în microscopia fonică de examinare a unui preparat biologic plasat într-o soluție care conține un pigment întunecat (microscopia pe fond întunecat).

Pigmentul servește ca fond negru în care se află depus preparatul fără a-l colora propriu-zis, deci fără a interacționa chimic cu acesta. Acest procedeu a fost adoptat pentru microscopia electronică în urma cercetărilor lui Hall (1955) și Huxley și apoi standardizat ca metodă de "colorare negativă".

Metoda constă în depunerea unui preparat biologic transparent la electroni (ribozomi, mitocondrii, etc) obținut prin fracționare celulară pe un pat de colorant opac la electroni (acid fosfotungstic, molibdat de amoniu, acetat de lantan, acetat de uranil, etc) și apoi examinat la microscopul electronic.

Prin această tehnică se pot studia structurile tridimensionale ale biomoleculelor, virusurilor, organelor celulare purificate.

În prezent se cunosc mai multe substanțe care, prin dizolvare în apă distilată pot servi ca matrice de includere a preparatelor biologice.

Substanțele care pot fi folosite cu succes pentru studiul biomoleculelor, virusurilor, structurilor subcelulare purificate sunt: acid fosfotungstic, tungstat de sodiu, de litiu, molibdat de amoniu, silicat de sodiu, nitrat de uranil, acetat de uranil, etc.

Dintre procedeele folosite curent în laboratoare, amintim: colorare directă, colorare pe grilă, colorarea prin imersiune, prin flotare și aplicarea prin pulverizare.

4.8.4. Metalizarea

Pentru mărirea contrastului unui preparat biologic se folosește și metalizarea care a fost multă vreme singurul mijloc de mărire a contrastului unor preparate biologice cum sunt virusurile, bacteriile și anumite structuri ale acestora (cili, flageli, fimbrii) anumite structuri celulare în stare purificată (ribozomi, mitocondrii, membrane), unele biomolecule cum sunt acizii nucleici și enzimele.

Metoda constă în evaporarea unui metal sub vid (aur, platină, paladiu, etc) în aparate de metalizare și depunerea pulberii atomice sub un anumit unghi pe preparatul biologic.

Procedeul a fost folosit pentru prima dată de Muller (1942), apoi, metoda a fost perfecționată.

În practică la aplicarea acestei metode trebuie să se ia în considerare următoarele: a) aparatul folosit la metalizare, b) materialele care urmează să fie evaporate în funcție de preparatul biologic ce trebuie examinat, c) suportul de evaporare, d) distanța și unghiul de evaporare, e) grosimea stratului evaporat.

a) Aparate de metalizare

Numeroase firme produc diferite tipuri de aparate folosite la metalizare, din ce în ce mai perfecționate, ce realizează un vid înaintat necesar unei evaporări de mare finețe, au surse multiple de evaporare, oferind posibilitatea evaporării simultane din mai multe surse și a aprecierii grosimii stratului de metal chiar în timpul depunerii.

b) Materiale pentru metalizare

Practica arată că cele mai bune materiale pentru metalizare sunt cele cu densitate mare și care se depun în cantitate mică, asigurând un contrast bun preparatelor biologice. Se includ aici: cromul, aurul, aliajul aur-paladiu, uraniu, tungstenul, sau oxizii de tungsten, platina, etc.

c) Suportul pentru evaporare

Există o gamă largă de suporturi pentru evaporare cu care sunt echipate

aparatele de metalizare. Ea se poate face în: coșulețe din tungsten, din containere mici de tungsten, molibden, grafit sau din creuzete mici de ceramică prevăzute cu filamente de tungsten.

La alegerea suportului de evaporare în raport cu un anumit material, trebuie să se țină seama dacă suportul produce sau nu un aliaj cu materialul ce urmează a fi evaporat.

La realizarea procesului de evaporare în vid un rol important îl are și calitatea vidului.

Evaporarea se poate obține în diferite moduri, foarte des fiind folosită evaporarea cu ajutorul unui arc electric (utilizat frecvent la evaporarea carbonului sau a amestecului carbon - platină).

Tehnicile de metalizare sunt de neînlocuit în cercetările privind configurația moleculară a acizilor nucleici, pentru obținerea replicilor de pe diferite structuri biologice, în special în metodele de congelare și uscare în vid sau de înghețare, fracturarea și sublimarea în vid și la acoperirea preparatelor biologice ce trebuie examinate la microscopul de transmisie (T.E.M), baleiaj (S.E.M.) sau transmisie și baleiaj (S.T.E.M.).

V. METODE CURENTE DE CITO ȘI ULTRACITOCHIMIE

5.1. METODE CURENTE DE CITOCHIMIE

Prin citochimie se realizează identificarea și localizarea unor compuși chimici celulari pe preparatele biologice destinate studiului la microscopul fonic.

Utilizarea tehnicilor de citochimie face posibilă vizualizarea localizării cât mai exacte a substanțelor cercetate la nivel celular prin reacții ce culoare, realizându-se concomitent o analiză chimică și una morfologică (topochimie).

Metodele citochimice trebuie să îndeplinească două condiții esențiale:

- + să facă posibilă identificarea specifică și constantă a substanței, chiar dacă aceasta se află în cantități foarte mici;
- + localizarea topografică precisă a substanței cercetate.

5.1.1. *Recoltarea pieselor* se face prin aceeași tehnică descrisă la capitolul 2.1.1.

5.1.2. *Fixarea* se realizează prin:

a. Agenti fizici- criofixare, criodeshidratare și criosubstituție (vezi capitolul 2.1.2.1., 2.3.3. și 2.3.4.).

În fixarea prin agenți fizici factorul esențial îl reprezintă congelarea cât mai rapidă a pieselor la o temperatură cât mai scăzută.

Avantajele fixării prin agenți fizici sunt următoarele:

- + oprește orice activitate enzimatică împiedicând astfel autoliza celulară post-mortem;
- + conservarea structurilor celulare achivalează cu cele mai bune fixări chimice pentru citologie;
- + deplasarea substanțelor solubile sau difuzibile este mai redusă decât în orice alt procedeu de fixare.

b. Fixarea prin agenți chimici trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- + să nu deplaseze dintr-un sector în altul substanțele de cercetate;
- + să nu le dizolve;
- + să nu le modifice structura;
- + să permită desfășurarea normală a reacțiilor chimice care urmează a fi aplicate;

Nu există agent fixator chimic universal care să conserve toate

substanțele evidențiabile prin reacții citochimice. Un fixator dat poate stabiliza într-o măsură mai mare sau mai mică anumite substanțe, dar în același timp, prin solubilizare, el poate îndepărta parțial sau total alte substanțe.

Cei mai utilizați fixatori sunt:

1. Carnoy pentru -glicogen
 -mucopolizaharide 1-2 ore
 -proteine
 -acizi nucleici
2. Formol 10% tamponat -proteine
 -lipide 12-24 ore
3. Sublimat dicromat de K. -fosfolipide 72ore

Durata fixării este mult mai strictă în citochimie și citoenzimologie deoarece poate interveni o acțiune extractivă a fixatorului asupra unor componenți chimici.

Volumul fixatorului va fi suficient de mare pentru a împiedica diluarea lui cu apa din piese; în timpul fixării va fi schimbat de 1-2 ori.

Temperatura fixatorului influențează atât procesele de autoliză cât și viteza de pătrundere în piesă. Se preferă fixarea la rece la $+4^{\circ}\text{C}$ care previne autoliza dar mărește durata fixării.

Fixatorii trebuie să aibă un p.H. cât mai apropiat de valorile fiziologice (p.H. = 7,2 - 7,4).

5.1.3. Includerea. Efectul tuturor factorilor implicați în procesul de includere (solvenți organici, temperatura, durată, etc), asupra diferiților constituenți chimici celulari trebuie bine cunoscut deoarece ceea ce s-a păstrat corect prin fixare se poate pierde la includere.

Marea majoritate a metodelor de citochimie și citoenzimologie se realizează prin tehnica criotomie iar cele care folosesc fixatori chimici utilizează includerea la parafină.

5.1.4. Secționarea. Pentru piesele incluse la parafină secționarea se face după tehnica descrisă la capitolul 2.1.5.

Pentru fragmentele fixate prin agenți fizici, secționarea se face după tehnica descrisă la capitolul 2.3.2.

Lipirea secțiunilor pe portobiect se face cu albumină, glicerină, amidon, gelatină, etc. Soluția pentru lipirea secțiunilor trebuie aleasă în funcție de reacția citochimică ce urmează să se facă, de exemplu în reacțiile

pentru glicogen, etc. lipirea cu aceste substanțe este contraindicată, recurgându-se la procedeul uscat.

Reacțiile citochimice au drept scop final furnizarea, la examenul microscopic al preparatului, a unui semnal (sub formă de culoare) care să ne informeze corect asupra prezenței unei/unui grup de substanțe.

În marea lor majoritate aceste reacții evidențiază doar grupe de substanțe și mai ales radicali sau funcții chimice, ca de exemplu: proprietatea reducătoare, oxidantă, bazofilia, metacromazia, etc.

În lucrările curente de citochimie, aprecierea rezultatelor se face de obicei numai sub aspect calitativ, adică substanța cercetată este prezentă sau absentă, completându-se cu observații de ordin cantitativ, precizând că substanțele respective se află în cantitate foarte redusă (\pm), moderată (+), mare (+ +), foarte mare (+ + +) sau absentă (-).

5.1.5. Evidențierea citochimică a unor substanțe minerale

Detectarea citochimică a unor substanțe minerale are o deosebită importanță pentru citofiziologie, morfopatologie, toxicologie, medicina legală, etc.

5.1.5.1. Detectarea fierului ionic (Perls-Gomori)

În țesuturile animale fierul se află sub două forme:

+fierul ionic (Fe^{3+}) ușor de pus în evidență prin metode foarte specifice și sensibile;

+fierul mascat, evidențiabil prin metode chimice aplicate după folosirea unui procedeu de demascare.

Se recomandă fixarea în formol neutru 10% sau Bouin și includere la parafină.

+Secțiunile deparafinate, hidratate

+După Gomori, colorarea timp de 5 minute într-o soluție proaspătă de ferocianură de potasiu 5% după care, în baia respectivă se adaugă acid clorhidric 10% în proporție de 1/2 din volumul reactivului se agită și preparatele se mai lasă încă 10-20 minute.

+Spălare în apă distilată,

+Colorarea nucleară cu fuxină bazică sau safranină urmată de colorarea citoplasmei cu o soluție apoasă saturată de acid picric timp de 5-10 secunde.

+Spălarea rapidă în apă destilată, deshidratare, clarificare și montare

în balsam de Canada.

Rezultate

Ionii ferici (Fe^{3+}) reacționează cu ferocianură de potasiu formând un precipitat granular albastru de ferocianură ferică (albastru de Prusia); nucleii se colorează în roșu iar citoplasma în galben.

5.1.5.2. Detectarea calciului ionic (Kossa - Gomori)

În organismul metazoarelor, calciul se află sub trei forme: ionică și solubilă, ionică și insolubilă, mascată.

Numai forma ionică și insolubilă poate fi detectată prin metode citochimice.

+fixarea în formol neutru 10%, includere la parafină.

+secțiuni deparafinate și hidratate.

+tratarea secțiunilor la întuneric cu o soluție de nitrat de argint 2 - 5% în apa distilată timp de 5-30 minute.

+spălarea în apă distilată.

+tratarea timp de 2 minute și la lumina zilei cu o soluție apoasă de hidrochinonă 0,5%.

+spălarea în apă distilată.

+tratarea 30 secunde - 1 minut cu o soluție de tiosulfat de sodiu 5%.

+spălarea în apă de robinet, colorarea nucleară cu safranină, deshidratare, clarificare, montare în balsam de Canada.

Rezultate: Structurile conținând săruri insolubile de calciu se colorează în negru iar nucleii în roșu.

5.1.6. Evidențierea citochimică a glucidelor

Glucidele sunt aldehide-cetone a unor alcooluri polihidroxilice cu rol deosebit în activitatea celulară. Ele sunt substanțe energetice de prim ordin (ex. glicogenul); se pot combina cu proteinele (glicoproteine) sau cu lipidele (glicolipide) cu rol structural și funcțional.

Din grupa holozidelor numai polizaharidele pot fi evidențiate citochimic iar din cea a heterozidelor, mucopolizaharidelor (M.P.Z.) neutre și acide, glicoproteinele și glicolipidele.

Principiile citochimice de evidențiere a glucidelor au la bază:

1 - reacții bazate pe grup aldehyd (ex. reacția Schiff - P.A.S.);

2 - reacții bazate pe grup glicol (ex. reacția acid periodic Schiff, reacții de blocare prin acetilare);

- 3 - reacții bazate pe grup alcool (ex. esterificare sulfurică);
- 4 - reacții bazate pe grup acid (ex. bazofilie, metacromazie, capturare de fier coloidal);
- 5 - colorații signaletice (ex. albastru alcian, aldehidfuxina).

Pentru exemplificarea detectării glucidelor vom recurge la metoda metacromaziei, ușor de executat pe secțiuni în timpul orelor de lucrări practice.

Colorarea selectivă a unor structuri celulare sau tisulare în alte nuanțe decât cea a soluției colorante se numește **reacție sau colorație metacromatică**.

Substanțele care răspund la reacția metacromatică fac parte din grupa mucopolizaharidelor, acizilor nucleici și a lipidelor cu caracter acid.

- +fixarea în Carnoy, include la parafină,
- +deparafinare, hidratare,
- +colorare timp de 2 minute în soluție de albastru de toluidină 0.5 %
- +spălare în apă distilată,
- +montare în glicerină-gelatină.

Rezultate: substratele metacromatice apar colorate în roșu violaceu iar restul structurilor preparatului sunt colorate ortocromatic în albastru.

Reacția P.A.S. pozitivă pune în evidență glicogenul, M.P.Z. și mucoproteinele neutre, glicoproteinele, glicolipidele.

5.1.7. Evidențierea citochimică a lipidelor

Lipidele rezultă din unirea unui alcool cu acizi grași superiori și au rol energetic, structural și funcțional.

Din punct de vedere chimic se clasifică în lipide simple (trigliceride sau grăsimi neutre și sterice sau esteri de colesterol) și lipide complexe (glicerofosfatide ca de ex. : lecitină, cefalină, cardiolipina și sfingolipide de tipul sfingomielinei, glicosfingolipide ca de ex. : cerebrozide, cerebrosulfatide și ganglioze).

În evidențierea citochimică a lipidelor se recurge la colorații generale, reacții pentru anumiți radicali (carbonil, sterol), reacții pentru evidențierea caracterului acid, nesaturat, etc., reacții pentru componente glucidică, proteică.

Colorațiile generale pentru evidențierea **lipidelor totale** se fac cu ajutorul lizocromilor Sudan BB, III și IV; aceștia dau indicații asupra constituției chimice a lipidelor (lipide simple sau complexe). Tehnica de lucru este următoarea:

- + fixarea pieselor în formol neutru 10%
- + Secțiuni la gheață (lipidele sunt solubile în solvenți organici motiv pentru care includerea la parafină este contraindicată).
- + spălare în apă de robinet pentru eliminarea excesului de fixator.
- + deshidratare rapidă în alcool etilic 50% și 70%
- + colorare timp de 30 minute în soluție
 - Sudan BB -0,3g
 - Alcool 70% -100cc
- + spălare, deshidratare în alcool etilic 70%, 50%, apă robinet, montare în gelatină - glicerină

Rezultate: lipidele totale se colorează în albastru.

5.1.8. Evidențierea citochimică a proteinelor

Proteinele, structuri macromoleculare alcătuite din aminoacizi, reprezintă cea mai importantă grupă de substanțe organice din celule.

În raport de produșii eliberați prin hidroliză, proteinele se clasifică în:

- 1) **Holoproteine** care eliberează numai aminoacizi, cuprind:
 - a. proteine globulare (protamina, albumine, globuline);
 - b. proteine fibrilare (fibrinogen, miozină, actină, collagen, elastină, scleroproteine).

2) **Heteroproteine** sau proteine conjugate care conțin pe lângă proteine și compuși neproteici sau grupări prostetice. Din această grupă fac parte:

- a. cromoproteine (conțin hemoporfirina);
- b. glicoproteine (conțin galactoză);
- c. mucopolizaharide (conțin acizi uronici, glucozamină);
- d. lipoproteine (colesterol, fosfolipide, trigiceride);
- e. nucleoproteine (A.D.N. și A.R.N.);
- f. metaloproteine (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}).

Din punct de vedere al nivelului de organizare structurală proteinele cuprind:

1. structuri primare - secvențe de aminoacizi;
2. structuri secundare;
3. structuri terțiare;
4. structuri cuaternare.

Metodele citochimice detectează numai structura primară a proteinelor.

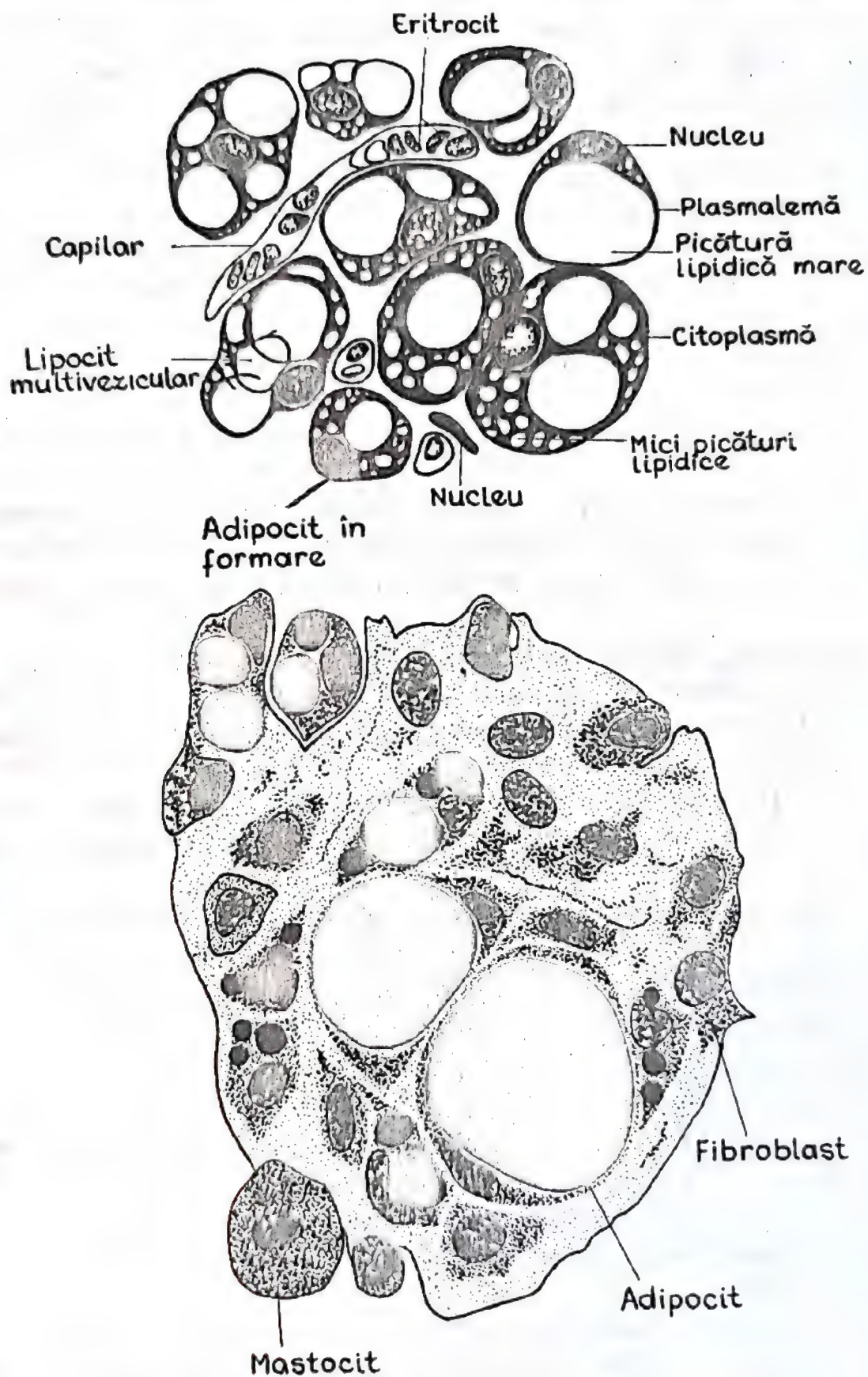


Fig.27. Aspectul lipidelor totale: A - după includerea la parafină și colorarea cu H.E.; B - după secționarea la gheață și colorarea cu Sudan.

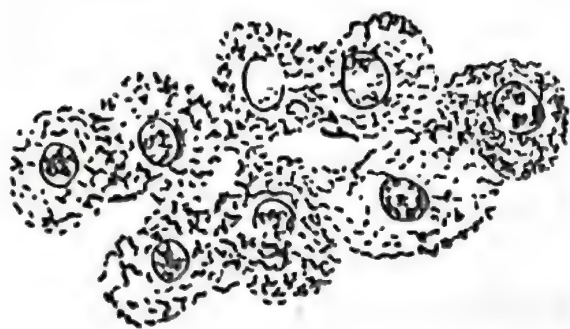


Fig.28. Proteinele totale din hepatocite (colorația cu albastru de brom - fenol).

Pentru exeplicare descriem **tehnica determinării punctului izoelectric al proteinelor prin extincție cu albastru de metilen**: care se bazează pe caracterele electropolare a unei proteine date.

Se cunoaște că în funcție de valoarea p.H. - ului dintr-un mediu, o proteină se comportă din punct de vedere electric:

- **electronegativ** atunci când predomină grupări ionizabile carboxil (COO^-) funcționale, situație în care proteina are afinitate pentru coloranți bazici (cationici), maximă la p.H. alcalin;

- **electropozitiv** când predomină grupări ionizabile NH_3^+ funcționale, caz în care proteina are afinitate pentru coloranți acizi (anionici), maximă la p.H. acid.

Punctul izoelectric este valoarea p.H.-ului la care o proteină este echilibrată din punct de vedere electric (grupările ionizabile electronegative și cele electropozitive sunt în număr egal) și se determină prin extincția cu albastru de metilen.

Tehnica este următoarea:

- + fixarea fragmentelor de organ sau țesut în Carnoy;
- + includere la parafină;
- + deparafinarea secțiunilor, hidratare;
- + tratarea câte unui preparat cu tampon Michaelis (acetat- veronal sodic) la p.H.-uri diferite: 4,7 și 9;
- + fiecare preparat se ține 10 minute într-o soluție de albastru de metilen 0,13% în tampon Michaelis (părți egale) cu valoarea p.H.-ului identică ce cea a tamponelor utilizate anterior;
- + spălarea rapidă în amestecul, tampon Michaelis cu valoarea p.H. identică cu cea a soluției colorante și apă distilată fiartă (părți egale);
- + tratarea celor trei preparate colorate la p.H.-uri diferite cu o soluție de molibdat de amoniu 5% timp de 10 minute;
- + spălare 2 - 5 minute în apă distilată;

+ sugativare, deshidratare în alcool etilic 100%, clarificare și montare în balsam de Canada.

Rezultate: substanțele bazofile (COO)- se colorează ortocromatic în albastru, cu maximum de intensitate la p.H. alcalin.

Pentru evidențierea acizilor nucleici se utilizează mai multe metode, cele mai utilizate fiind cele propuse de Brachet și Feulgen.

5.2. EXAMINAREA ULTRASTRUCTURALĂ A UNOR COMPUȘI CHIMICI CELULARI

Ultracitochimia sau cercetarea la nivel ultrastructural a unor substanțe chimice se realizează prin asocierea metodelor de microscopie electronică cu cele de citochimie fonică.

Prin aceste tehnici se pot localiza la nivel ultrastructural unele substanțe minerale și organice.

VI. METODE CURENTE DE CITO ȘI ULTRACITOENZIMOLOGIE

6.1. DATE GENERALE

Enzimele sunt biomolecule de natură organică care catalizează reacțiile de sinteză și degradare din substanța vie, acești biocatalizatori joacă un rol fundamental în reglarea proceselor metabolice precum și în toate procesele de creștere și regenerare tisulară.

Activitatea unor enzime depinde numai de structura lor proteică pe când altele necesită prezența unor cofactori (componente neproteice). Cofactorul poate fi un ion metalic (K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+}) sau o moleculă organică numită coenzimă (funcționează ca transportori intermediari în toate reacțiile enzimatiche).



Fig. 29 Localizări enzimatică la nivelul ultrastructurilor celulare.

După clasificarea internațională există 6 clase de enzime:

1. oxido-reductaze (reacții de oxido-reducere);
2. transferaze (transferă grupări funcționale);

3. hidrolaze (reacții de hidroliză);
4. liaze (adiție la dubla legătură)
5. ligaze (formare de legături cu scindare de A.T.P.);
6. izomeraze (reacții de izomerizare).

Citoenzimologia are drept scop evidențierea localizării unei activități enzimatică în celulă care oferă o imagine reală asupra metabolismului diferitelor țesuturi și organe.

Localizarea enzimelor într-o celulă se realizează pe baza unor reacții chimice între enzime și substraturi ce au ca produs final un precipitat colorat și insolubil; când este solubil se trece la insolubilizarea lui printr-o "reacție de captură".

Cinetica unei reacții enzimatică este influențată în general de următorii factori:

+ **saturarea ca substrat** reprezintă o trăsătură proprie cineticii reacțiilor chimice catalizate de enzime și se face după ecuația Michaelis-Menten; constanta Michaelis a unei enzime este fundamentală nu numai pentru formularea matematică a cineticii enzimatică ci și pentru determinarea cantitativă a activității enzimatică în țesuturi.

+ **concentrația enzimei** - analiza cantitativă a activității enzimatică se realizează ușor când substratul sau produsul sunt colorate.

+ **valoarea p.H.-ului** - cele mai multe enzime au un p.H. caracteristic la care activitatea lor este maximă; p.H.-ul optim al unei enzime nu este neapărat identic cu p.H.-ul mediului său normal, intracelular, care se poate afla pe panta ascendentă sau descendentă a curbei sale p.H.-activitate (aceasta sugerează că relația p.H.-activitate a unei enzime poate fi un factor de control al activității sale intracelulare).

+ **temperatura de lucru** - se cunoaște că viteza reacțiilor catalizate de enzime crește cu temperatura pe intervalul de temperatură în care enzima este stabilă și își păstrează întreaga activitate, în mod obișnuit, temperatura de lucru este de 37°C.

+ **activatorii** reacțiilor de cataliză enzimatică - sunt substanțe care măresc viteza de reacție fie acționând prin deblocarea unei părți proteice ce maschează partea activă a enzimei fie prin protejarea enzimelor de inhibitori.

+ **inhibitorii** reacțiilor de cataliză enzimatică sunt o clasă de substanțe din al căror studiu rezultă informații valoroase asupra mecanismului și căilor de cataliză enzimatică, asupra specificității de substrat a enzimelor, a naturii grupelor funcționale din centrul activ și a participării anumitor grupe funcționale la menținerea informației active a moleculei de enzimă; în plus, inhibiția anumitor enzime de către metaboliți specifici este

un element important în reglarea metabolismului intermediar.

+ **timpul de incubație**: prin cercetări biochimice s-a constatat a fi de 20-30 minute.

6.2. TEHNICA CITOENZIMOLOGICĂ

Principalele etape ale obținerii preparatului pentru reacții enzimatică sunt în parte asemănătoare cu cele din citologia clasică (recoltarea, fixarea, secționarea, montarea) dar prezintă două etape caracteristice: incubarea și vizualizarea.

6.2.1. **Recoltarea**. Spre deosebire de citologia clasică, reacțiile citoenzimologice se fac numai pe fragmente de țesuturi sau organe recoltate "in vivo" (intervenții chirurgicale sau puncții - biopsie) sau imediat după sacrificarea animalelor de experiență.

6.2.2. **Fixarea** are drept scop conservarea activității enzimatică și o stabilizare cât mai mare a enzimei în celulă. În acest scop se pot utiliza:

- fixatori fizici**- congelarea rapidă a fragmentelor montate pe portobiecte, în azot lichid la -180°C este cea mai utilizată;
- fixatori chimici**: glutaraldehidă, alcool, acetonă.

6.2.3. **Incubarea** reprezintă cea mai importantă etapă din tehnica de evidențiere a unei activități enzimatică, folosind în acest scop un mediu care să ofere enzimei condiții optime pentru desfășurarea activității ei.

Utilizarea mediului de incubație, diferit în raport de enzima cercetată, are două scopuri majore:

- să permită formarea cuplului enzimă + substrat care reprezintă de fapt activitatea enzimatică;
- să facă insolubil produsul de reacție (enzimă + substrat).

Enzimele prezintă două fracțiuni:

- + o fracțiune hidrosolubilă sau lioenzimă;
- + o fracțiune liposolubilă numită desmoenzimă

Lioenzimele se pierd în timpul diferitelor manopere pentru obținerea preparatului citoenzimatic, evidențiindu-se desmoenzimele.

Dacă produsul de reacție (enzimă + substrat) este solubil ca în cazul hidrolazelor, el trebuie transformat într-un produs insolubil printr-un procedeu numit "captură". De exemplu dacă produsul de reacție este un anion (fosfat, carbonat), el devine insolubil prin captarea de ioni metalici

(plumb).

Pentru realizarea acestor scopuri mediul de incubare trebuie să conțină:

- + substratul specific (natural sau sintetic) enzimei a cărei activitate urmează a fi pusă în evidență (exemplu de substrat pentru evidențierea activității oxidoreductazei utilizează sărurile de tetrazoliu);

- + substanța care asigură insolubilizarea produsului de reacție (în cazul fosfatazelor, prin hidroliză enzimatică se eliberează anionul fosfat care este precipitat prin "captura" de cationi de Ca^{2+} pentru fosfataza alcalină și Pb^{2+} pentru fosfataza acidă; acești "cationi de captură" se adaugă mediului de incubare sub formă de clorură de calciu și respectiv azotat de plumb);

- + substanța care permite vizualizarea, de exemplu sulfura de amoniu va forma în cazul fosfatazei acide - sulfura de plumb - substanță cromoforă de culoare brun închisă (aceasta poate fi vizualizată microscopic și indică citotopochimic activitatea enzimatică a fosfatazei acide;

- + soluții tampon care conferă mediului de incubare un anumit p.H., știut fiind faptul că activitatea fiecărei enzime se desfășoară la un anumit p.H. optim de acțiune.

O importanță deosebită o are **timpul de incubare**, stabilindu-se că saturarea enzimei cu substrat se face în aproximativ 20 minute; se recomandă totuși tatonarea timpului optim de incubare. Pentru a căpăta certitudinea specificității de reacție este necesară efectuarea unor preparate de control care se obțin prin diferite procedee, de activare sau inhibare a activității enzimatice.

6.2.4. Montarea secțiunilor se face cu medii hidrosolubile - glicerina și siropul Apathy.

6.2.5. Prin vizualizarea activității enzimatice se înțelege detectarea și localizarea la microscop a unei anumite culori cu aspect granular sau difuz.

Vizualizarea indică în principiu: locul activității enzimatice (aspectul citotopochimic al vizualizării) și intensitatea tinctorială care pune în evidență intensitatea activității enzimatice (aspectul de citoenzimologie cantitativă a vizualizării).

ATENȚIE: preparatele citoenzimologice trebuie examinate și fotografiate imediat după realizarea lor deoarece se degradează rapid (decolorarea sau cristalizarea mediului în care s-a făcut montarea).

6.3. DETECTAREA CITOENZIMOLOGICĂ A OXIDO-REDUCTAZELOR

Enzimele din grupul oxido-reductazelor catalizează reacțiile de oxidare și reducere din celula vie.

Reacțiile de oxido-reducere (reacții redox) sunt acele reacții în care are loc un tranfer de electroni de la un donator de electroni (agentul reducător) la un acceptor de electroni (agentul oxidant).

Transportul de electroni este principalul izvor motor al activităților celulare deoarece el eliberează o mare cantitate de energie liberă, conservată în mare parte sub forma grupărilor fosfat macroergice ale A.T.P.-ului, în urma procesului numit fosforilare oxidativă.

Există patru tipuri de enzime de oxido-reducere sau proteine care transferă electroni:

1. *Dehidrogenazele legate de nucleul piridinic*, sau piridin-dependente (necesită drept coenzime N.A.D. sau N.A.D.P.) dintre care unele sunt localizate în mitocondrii (beta-hidroxi-butirat dehidrogenază), altele în citoplasmă (lactat dehidrogenază) iar unele se găsesc în ambele componente (malat-dehidrogenază).

2. *Dehidrogenazele legate de nucleul flavinic* sau flavin-dependente conțin flavin-adenin dinucleotid (F.A.D.) sau flavin mononucleotid (F.M.N.) care funcționează mai degrabă ca grupare prostetică decât ca o coenzimă.

Din această grupă fac parte N.A.D.H. - dehidrogenaza și succinat dehidrogenaza (clasa dehidrogenazelor care conțin fier și sulf) și D-aminoacid oxidaza (clasa oxidaze), ele făcând parte din echipamentul enzimatic mitocondrial; mai fac parte: dihidrolipoil dehidrogenaza (un component al sistemelor piruvat și alfa - cetoglutarat dehidrogenazelor) și acetil - CoA dehidrogenaza (care catalizează prima etapă de dehidrogenare din oxidarea acizilor grași).

3. *Proteine cu fier-sulf* (centrii Fe - S) din care proteina cu fier-sulf cu potențial mare (cu citocrom C₁) este localizată la nivel mitocondrial.

4. *Citocromii* sunt proteine transportatoare de electroni care conțin grupări porfirinice cu fier, prezenți numai în celulele aerobe.

Unii sunt localizați în membrana internă a mitocondriilor unde acționează secvențial pentru a transporta electronii proveniți de la diferite sisteme ale dehidrogenazelor până la oxigenul molecular (citocromii b, C₁, C, a și a₃) - iar alții se află în reticulul endoplasmatic jucând un rol important în reacțiile de hidroxilare specializate (citocromul b₅).

Succinat dehidrogenaza

Activitatea acestei enzime se poate pune în evidență prin tehnica lui Nachlas și colaboratorii.

Se folosesc secțiuni obținute la criotom din ficat sau mușchi striat proaspăt.

Principiul este următorul: succinat dehidrogenaza eliberează hidrogenul din sărurile acidului succinic pe care le transformă în fumarat; hidrogenul eliberat este acceptat de o sare de tatrazoliu care se reduce în formazan insolubil și colorat.

Rezultatul pozitiv al reacției este indicat de un precipitat bleu de diformazan (granule violete prin metoda Pearse).

6.4. DETECTAREA CITOENZIMOLOGICĂ A HIDROLAZELOR

Hidrolazele sunt enzime care catalizează reacțiile de scindare hidrolitică a moleculelor complexe: proteinele în aminoacizi, polizaharidele în monozaharide, lipidele în acizi grași și glicerină.

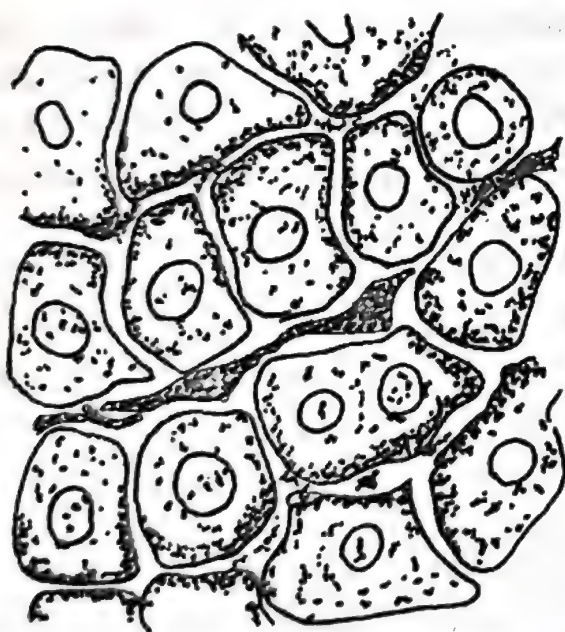


Fig.30. Fosfataza acidă la nivelul hepatocitelor.

Fosfataza acidă.

Este enzima marker a lizozomilor; activitatea ei se detectează cu tehnica Gomori.

Principiul acestei reacții constă în faptul că fosfataza acidă acționează asupra beta - glicerofosfatului de sodiu (substrat cu p.H. 5 - 5,7) pe care îl hidrolizează în glicerol și ortofosfat de sodiu - acesta din urmă reacționează

cu ioni de Pb^{2+} formând fosfatul triplumbic insolubil care, în prezența polisulfurii de amoniu se transformă într-un precipitat de sulfură de plumb.

Rezultate: locurile cu activitate acid fosfatazică apar sub forma unor granule negru-brun.

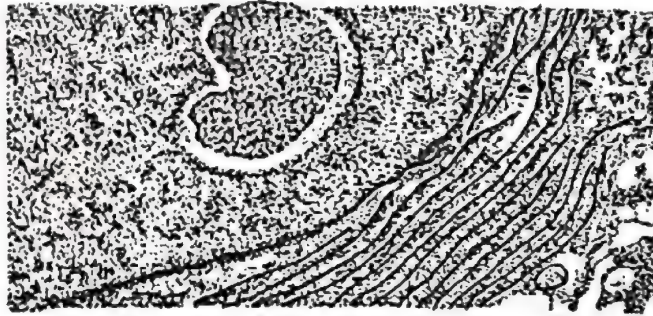


Fig.31. Activitatea peroxidazei la nivel ultrastructural.

VII. STUDIUL GENERAL AL CELULEI ȘI AL ÎNVELIȘULUI CELULAR

7.1. DATE GENERALE DESPRE CELULĂ

Celula reprezintă unitatea morfologică și funcțională a lumii vii formată la regnul animal din:

A. Protozoare sau unicelulare.

B. Metazoare sau pluricelulare.

Marea majoritate a protozoarelor și toate metazoarele sunt alcătuite din celule care au următoarea structuralizare:

I. **Învelișul celular** format din glicoalix, plasmalemă și citoscheletul membranar, care separă mediul celular de cel extracelular.

II. **Protoplasma**, la nivelul căreia se desfășoară marea majoritate a proceselor biochimice ce mențin viața (fosforilarea oxidativă, biosinteze, etc.), cu participarea nemijlocită a învelișului celular. Ea formează:

1 - *nucleul* și

2 - *citoplasma*.

La rândul său, citoplasma formează două compartimente:

a. citoplasma nestructurată sau **hialoplasma** (substanța fundamentală a citoplasmei);

b. citoplasma structurată sau **morfoplasma** alcătuită din organele celulare: ribosomii sau corpusculii lui Palade, reticulul endoplasmatic neted și rugos, complexul Golgi, mitocondriile, lizozomii, peroxisomii, centrul celular (centriolii), microtubii și microfilamentele.

În afara organelor celulare, în citoplasmă se pot găsi incluziunile celulare care reprezintă substanțe de rezervă (picături de grăsime, glicogen), produse de secreție (pigmenți), acumulări de produși exogeni (particule de cărbune, siliciu).

Celulele cu o astfel de structură se numesc **Eucariote**, termen introdus de Chatton în 1925.

O mică parte din protozoare ca de exemplu bacteriile, nu au nucleu iar cromatina (A.D.N. - ul) se dispune sub forma unor bulgări numiți nucleotizi sau echivalenți nucleari. Aceste unicelulare fără înveliș nuclear (din care mai fac parte algele albastre - verzi, micoplasmele) sunt denumite **procariote**.

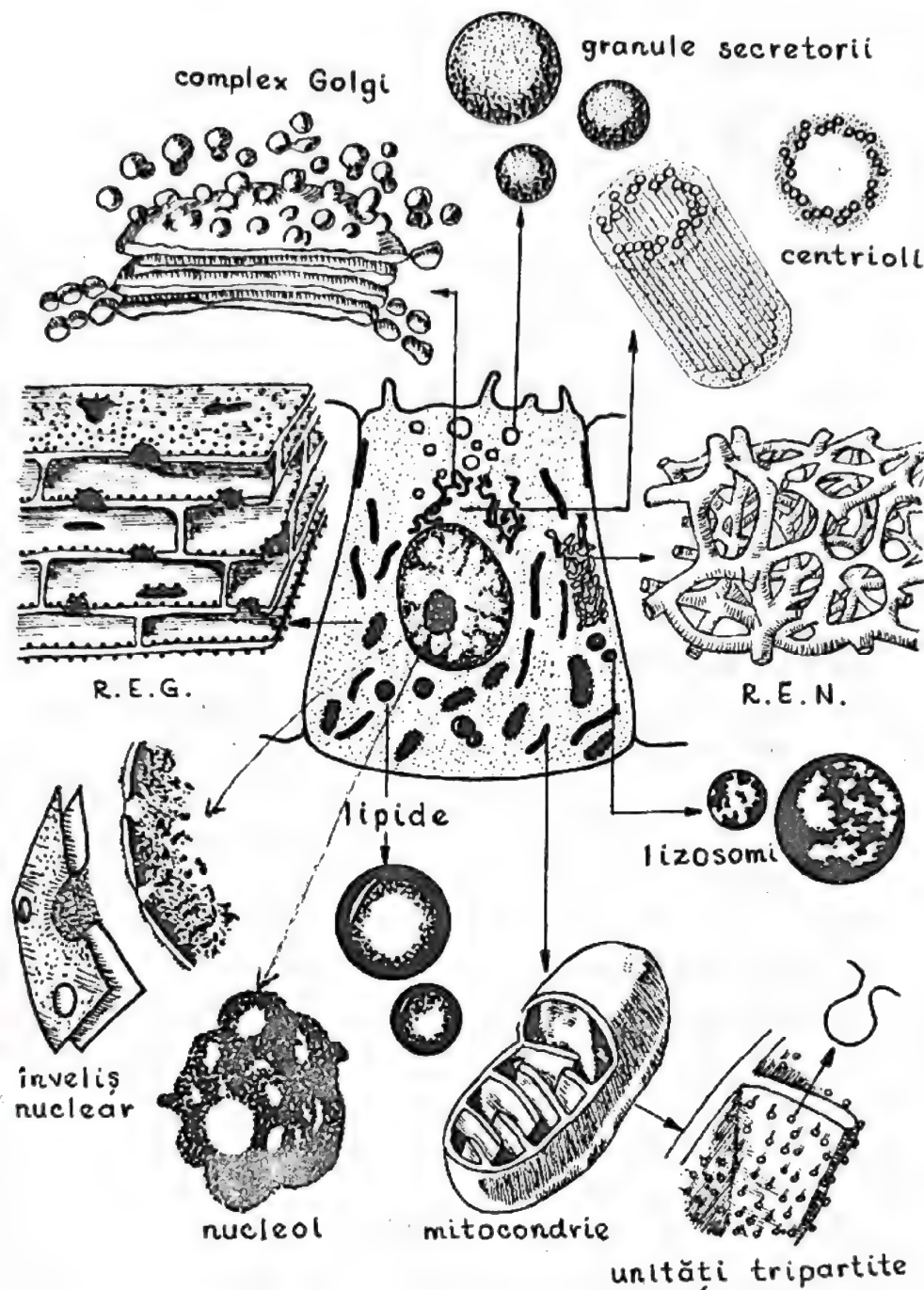


Fig.32. Aspectul structural al celulei în microscopia fonică și electronică.

Din punct de vedere evolutiv, procariotele sunt considerate strămoșii eucariotelor și, în ciuda diferențelor semnalate mai sus, există totuși o asemănare în organizarea și funcționarea lor moleculară: folosesc același cod genetic și au un mecanism similar de proteogeneză.

Virusii deși au proprietăți comune cu organismele vii:

autoreproducere, ereditatea și imunitatea, sunt dependente de celulele gazdă și sunt considerați paraziți.

7.2. ASPECTELE CELULEI ÎN FUNCȚIE DE TEHNICILE DE STUDIU ȘI DE OBSERVARE

7.2.1. În *microscopia fotonică* unitatea de referință este micronul sau micrometrul (μm) sau 10^{-3} mm deoarece dimensiunile celulelor sunt de ordinul micronilor.

Examinarea celulelor vii se poate face cu microscopul fonic însă diferențele de refringență ale constituenților celulari fiind foarte redusă nu permite observații de precizie și detaliate; microscopia în contrast de fază permite studiul mișcării celulelor vii care poate fi microcinematografiată.

În mod obișnuit celulele sunt studiate după fixare și colorare (în stare moartă). Substanțele fixatoare sunt utilizate pentru fixarea structurilor celulare într-o stare cât mai apropiată posibil de cea vie. Din fragmentele de țesut sau organ se fac secțiuni subțiri (aproximativ 5 microni) pentru a putea fi studiate prin transparență. Aceste secțiuni sunt aplicate pe lame portobiect și colorate cu diverși coloranți. Utilizarea coloranților permite studiul unuia sau altuia din constituenții celulari, ținând seama însă de puterea de rezoluție a aparatului.

Limitele de utilizare a microscopului fonic sunt determinate de lungimea de undă a luminii; distanța minimă între două puncte care se pot distinge net unul de celălalt se numește **putere de rezoluție** și este de 0,25 microni în spectrul vizibil (300 - 850 nm) iar mărimea maximă este de 1500 x - 2000 x.

La microscopul fonic celula apare mai mult sau mai puțin delimitată de o membrană celulară. Citoplasma este constituită dintr-un gel semilichid și transparent - hialoplasma - conținând diferite organite și incluziuni. Nucleul, a cărui membrană este mai mult sau mai puțin evidentă, ocupă diferite poziții în celulă; acest examen mai precizează că talia și forma unei celule sunt variabile de la un tip celular la altul și deseori, în timp, pentru aceeași celulă.

Utilizarea unor reacții de culoare specifice anumitor substanțe chimice sau a unor activități enzimatică - permite localizarea lor în celulă (citochimie și citoenzimologie).

7.2.2. *Microscopia electronică* utilizează electronii în loc de fotoni și are o putere de rezoluție aproape de limita teoretică posibilă 1,2 Å.

În microscopia electronică unitatea de măsură este milimicronul sau nanometrul (10^{-9} m) și Ångstromul (Å) sau 10^{-10} m.

Ca și în microscopia fotonică, celulele pot fi studiate în stare vie cu ajutorul microscopului electronic de voltaj înalt (tensiune de accelerare 3.500.000 - 4.000.000 V), sau stare moartă, fixate prin diferite metode și secționate la o grosime sub 600 Å.

Cu ajutorul microscopului electronic de transmisie se poate studia ultrastructura celulei la nivel molecular iar prin aplicarea unor tehnici speciale de citochimie și citoenzimologie se pot localiza diferite substanțe chimice și activități enzimatică.

Microscopul electronic cu baleiaj oferă posibilitatea studierii reliefului suprafeței celulare iar prin tehnica criodecapajului care permite clivarea membranelor celulare se poate evidenția relieful celor două suprafețe de clivaj (replici).

7.3. FORMA CELULELOR

Forma celulelor este foarte variată datorită funcțiilor de o mare diversitate și raporturilor diferite dintre ele precum și caracterele fizico-chimice ale mediului în care își desfășoară activitatea.

Din acest punct de vedere, un organism pluricelular este format din:

A. *Celule cu forme schimbătoare* - fac parte din grupul celulelor care își desfășoară activitatea într-un mediu lichid (celulele sanghine), având în mod obișnuit o formă sferică sau ovalară. Părăsind vasul și trecând în țesuturi, monocitele, își modifică forma căpătând un contur neregulat prin emiterea de pseudopode. Din această grupă mai fac parte și alte celule ale sistemului fagocitar.

Un alt exemplu îl constituie epiteliul mucoasei vezicii urinare care se aplatizează în momentul în care ea se destinde prin acumulare de urină.

B. *Celulele cu forme fixe* reprezintă marea majoritate a celulelor dintr-un organism pluricelular. Forma lor variază în funcție de natura celulelor, a funcțiilor specifice și a influențelor mecanice exercitate de elementele vecine.

Se întâlnesc:

1. *Celule sferice* - de ex. ovulul, celula grasă sau adipocitul, granulocitele din torentul circulator.

2. *Celulele poliedrice* (cubice și prismatice) intră alcătuirea țesutului epitelial (simplu și stratificat).

+ cubice: epiteliul foliculilor tiroidieni, etc;

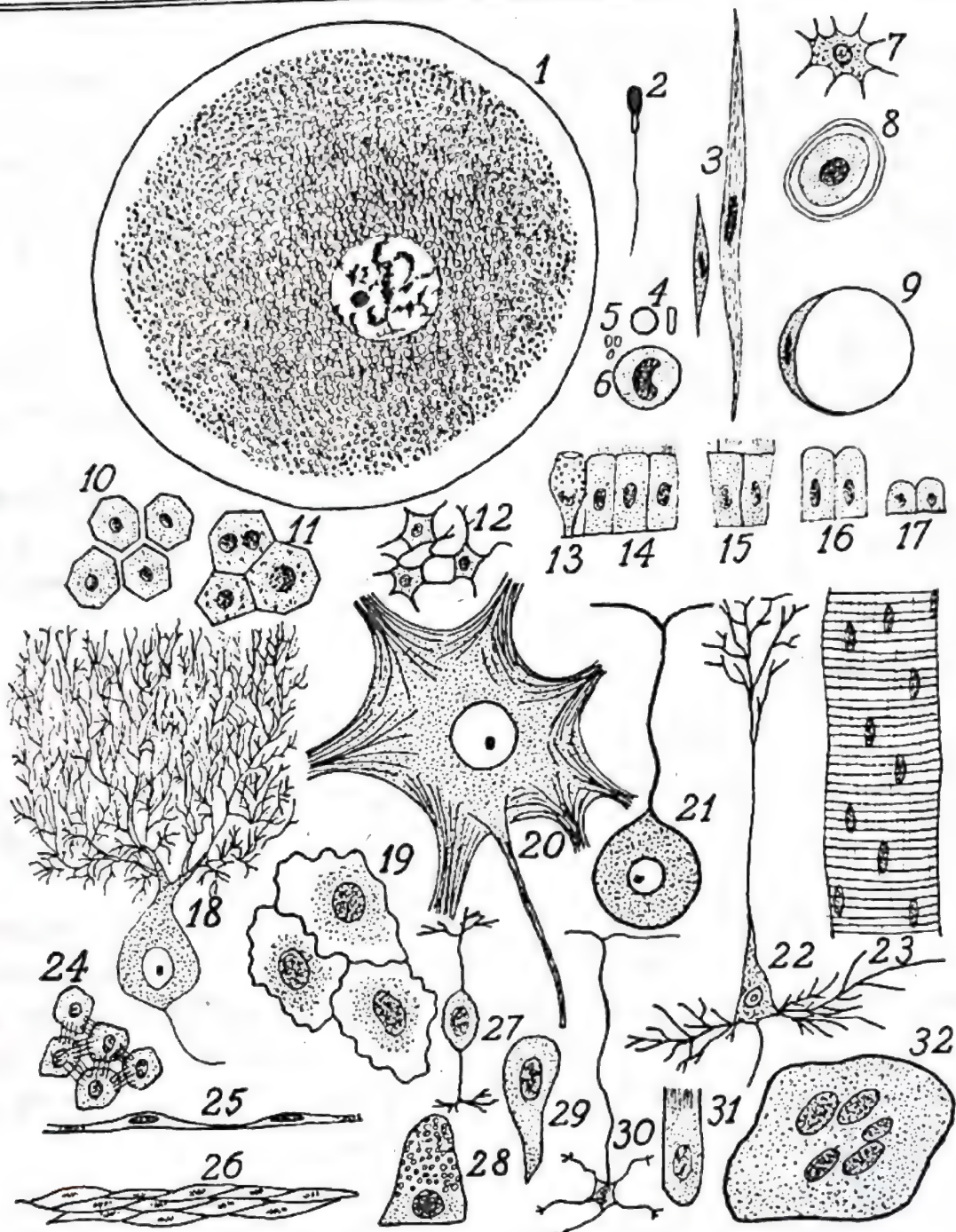


Fig.33. Forma și talia celulelor organismului. 1-ovul; 2-spermatozoid; 3-fibre musculare netede; 4-hematii; 5-globuline; 6-leucocit mononuclear; 7-celulă osoasă; 8-celulă cartilaginoasă; 9-celulă adipoasă; 10-celule din epiteliul posterior al corneei; 11-celule hepatice; 12-celule conjunctive; 13-celulă mucoasă; 14-celule din epiteliul intestinal; 15-celule cu cili vibratili; 16-celule prismatice; 17-celule cubice; 18. celulă nervoasă din cerebel; 19-celulă epitelială turtită; 20-celulă nervoasă multipolară; 21-celulă nervoasă unipolară; 22-celulă nervoasă piramidală; 23-fibră musculară striată; 24-celule spinoase din tegument; 25-celule endoteliale; 26-celule turtite suprapuse; 27-celulă nervoasă bipolară; 28-celulă glandulară; 29-celulă vezicală; 30-celulă din stratul profund al cerebelului; 31-celulă auditivă; 32-celulă din măduvă osoasă (policariocit).

+ prismatice: epiteliul mucoasei intestinale, etc.

3. Celulele pavimentoase iau parte la formarea seroaselor: pleură, pericard seros (mezotelii), endoteliul vascular, epiteliul foitei parietale a capsulei Bowmann (corpusculul renal Malpighi);

4. Celule fuziforme au partea centrală mai îngroșată iar cele două capete efilate (celula musculară netedă);

5. Celule cu prelungiri (celula nervoasă, osteocitul).

În condiții patologice și unele stări fiziologice, aceste forme se pot schimba; de exemplu fibroцитul, celulă conjunctivă fusiformă cu contur neregulat, poate deveni sferic prin acumulare de grăsimi.

7.4. DIMENSIUNILE CELULELOR

Afară de câteva excepții, toate celulele organismelor pluricelulare au dimensiuni sub limita de rezoluție a ochiului uman (diametrul lor este de ordinul micronilor), ele variind de la un tip celular la altul și în raport de specie.

Cea mai mare celulă din organismul uman este ovulul care are un diametru de 200 - 250 micrometri; unii motoneuroni din coarnele anterioare ale măduvei spinării au diametrul pericarionului de 100 micrometri. Celulele musculare striate pot atinge lungimi de 10 - 12 cm dar acestea sunt elemente gigante multinucleate și nu elemente celulare cu un singur nucleu ca în exemplele citate.

Dimensiunile medii, cel mai frecvent întâlnite sunt cuprinse între 20-40 micrometri (celule epiteliale, conjunctive, etc).

Cele mai mici celule sunt cele din stratul granular al scoarței cerebeloase ale căror diametru este de 4 - 5 micrometri. Dimensiunile celulelor suferă modificări în raport de starea funcțională, de condițiile mediului în care își desfășoară activitatea și de vârstă; de ex. celulele tinere (blăstele) au dimensiuni mai mari decât cele adulte (citele) sau cele îmbătrânite.

Volumul celulelor variază între 200 și 1500 micrometri.

7.5. NUMĂRUL CELULELOR

Numărul celulelor este variabil de la o specie la alta și relativ constant la indivizi din aceeași specie.

La organismele superioare și în special la om nu se poate vorbi de o constantă numerică absolută. La om, numărul de celule care alcătuiesc

fiecare organ este deosebit de ridicat (de ex. creierul uman este format din aproximativ 17.000.000.000 celule iar numărul de hematii este evaluat la 25.000.000.000.000).

7.6. ÎNVELIȘUL CELULAR

Învelișul sau periferia celulară este structura morfofuncțională complexă care separă mediul intracelular de cel extracelular, prin intermediul căruia se realizează comunicarea dintre cele două compartimente.

În microscopia electronică, periferia celulară apare ca o structură foarte complexă formată din:

- 1 - plasmalema (membrană celulară sau plasmatică);
- 2 - glicoalix;
- 3 - citoscheletul membranar.

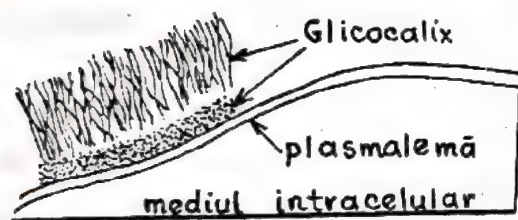


Fig.34. Membrana plasmatică și glicoalixul.

7.6.1. Plasmalema

Plasmalema este o membrană biologică cu o grosime de 7,5 - 10 nm.

7.6.1.1. Structura morfologică. În desenele didactice după examinarea preparatelor la microscopul fonic se obișnuiește ca fiecărei celule să i se prezinte periferia printr-o linie considerată ca membrană celulară.

Prin dimensiunile ei, plasmalema nu este vizibilă la microscopul fonic dacă este secționată transversal și după o colorație de rutină. La microscopul electronic, membrabei celulare i se disting trei straturi (structură trilamelată):

+ o pătură internă, densă la fluxul de electroni (osmiofilă) cu o grosime de 2,5 nm.

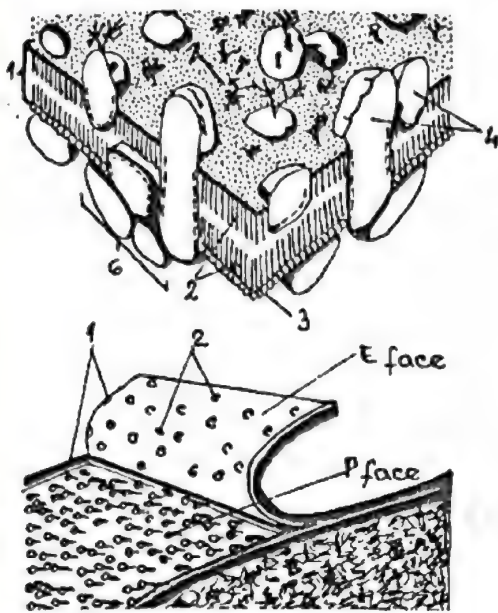


Fig.35. Ultrastructura membranei celulare. 1-strat bimolecular lipidic; 2-grupări hidrofobe; 3-grupări hidrofile; 4-proteine membranare; 5-lanțuri glucidice; 6-sisteme enzimatice membranare.

+ o pătură mijlocie, puțin densă la fluxul de electroni (osmiofobă) cu o grosime de 3 nm;

+ o pătură externă, densă la fluxul de electroni (osmiofilă) cu o grosime de 2,5 nm.

Prin crio fractură se poate studia aspectul celor două fețe de fractură evidențiindu-se proteinele transmembranare (planul de crio fractură trece prin mijlocul bistratului lipidic).

7.6.1.2. Organizarea moleculară. Studiile de biochimie au relevat că plasmalemele sunt formate din lipide, în special fosfolipide (40%), proteine (60%), glucide asociate.

În momentul de față, plasmalema este considerată ca un edificiu fluid traversat de proteine; acestea sunt transportori activi, complexe multienzimatic, receptori, etc.

După modelul în mozaic fluid al lui Singer și Nicolson (1972), membrana celulară este formată dintr-o dublă pătură lipidică traversată total sau parțial de proteine; acest model explică fluiditatea membranelor (deplasarea constituenților lipidici și proteici), fuziunea membranelor, activitățile enzimatice și antigenice.

7.6.1.3. Rolurile și proprietățile plasmalemei

1. *Proprietăți mecanice* - membrana celulară este extensibilă, elastică și plastică. Ea poate prezenta diferențieri morfologice de tipul zonelor de

adezivitate celulară, etc.

2. *Schimbările cu mediul exterior* (permeabilitate) adică trecerea particulelor vizibile la microscopul fonic sau electronic (fenomene de citoză), prin membrana celulară.

3. *Proprietățile antigenice corespund* fenomenelor de recunoaștere și sunt legate de existența receptorilor de suprafață. Fiecare din acești receptori poate fixa un element străin (virus, proteine, receptorul de suprafață al altei celule, hormon proteic, etc). Fixarea unei substanțe străine induce modificări în activitatea celulară.

4. *Încărcări electrice*. Repartiția inegală a ionilor de o parte și de alta a membranei antrenează polarizarea sa electrică (potențial de repaus).

Modificările de polarizare dau naștere curenților de acțiune de la suprafața membranei.

La microscopul fonic, plasmalema poate fi pusă în evidență prin unele reacții de detectare a unor substanțe chimice sau a unor activități enzimice localizate la nivel membranar.

7.6.2. *Glicocalixul*

Glicocalixul sau glicolema este o pătură glico-lipo-proteică situată pe suprafața externă a membranei plasmatică, de a cărei integritate depinde în mare măsură activitatea celulară.

La microscopul fonic, glicocalixul nu poate fi pus în evidență decât prin reacții de detectare citochimică a componentei glucidice (reacția P.A.S., cu albastru alcian, cu fier coloidal, etc) sub forma unei linii de culoare roșie sau albastră.

La microscopul electronic, glicocalixul cu o grosime de aproximativ 50 nm, are un aspect fibrilar și prezintă două zone: una internă sau învelișul de suprafață de 20 nm, mai puțin densă la fluxul de electroni și una externă de 30 nm, densă la fluxul de electroni. Această componentă a învelișului celular poate fi studiată mai bine printr-o tehnică specială care folosește feritină cationizată.

DE REȚINUT: glicocalixul este numai o componentă a complexului sistem care este membrana celulară.

7.6.3. *Citoscheletul membranar*

Citoscheletul membranar este constituit din rețele fibrilare cu rol în stabilizarea infrastructurii membranei și în mișcările locale ale suprafeței

celulare; reprezintă de fapt zona periferică a citoscheletului celulei și este constituit din proteine de tipul actinei, spectrinelor, ankirinei, etc.

7.7 SPECIALIZĂRILE ÎNVELIȘULUI CELULAR

Specializarea este o diferențiere structurală sau o transformare morfologică complexă care conferă celulei o anumită funcție; se clasifică în temporare (de ex. emiterea de pseudopode) și permanente.

Specializările permanente se găsesc la nivelul plasmalemei polului apical, polului bazal și la nivelul contactului a două celule vecine.

7.7.1. Specializările plasmalemei polului apical sunt evaginări ale ectoplasmei acoperite de membrană situate la nivelul suprafeței celulare care vine în contact cu mediul exterior. Ele asigură celulei o funcție bine stabilită ca de exemplu funcția resorbativă.

Din punct de vedere morfologic ele se clasifică în microvili, cili vibratili și flageli.

7.7.1.1. Microvili sunt expansiuni digitiforme ale suprafeței libere celulare care se găsesc:

+ **izolate**: la nivelul epiteliului mucoasei gastrice;

+ **grupate**: la nivelul:

- enterocitelor - platou striat

- nefrocitelor - margine în perie

- celulelor epiteliale din epididim și canale deferente -

stereocili.

a. În microscopia fonică microvili apar sub forma unor striatii perpendiculare pe suprafața plasmalemei apicale.

b. În microscopia electronică microvili platoului striat au dimensiuni egale iar a marginii în perie, inegale; sunt limitați la periferie de plasmalema trilamelată la exteriorul căreia se află un strat gros de glicolix. Citoplasma lor prezintă o zonă periferică de 40 - 30 nm lipsită de structură și o zonă centrală care conține 10 - 50 microfilamente de actină cu dispoziție paralelă.

Prin tehnicile de citoenzimologie se evidențiază o intensă activitate A.T.P. - azică și a fosfatazei alcaline.

Stereocili sunt elemente imobile a căror formă și structură este asemănătoare cu cea a microvililor deosebindu-se de aceștia prin numărul mic al microfilamentelor dispuse neregulat. Se aglomerează mai mulți la un loc formând conglomerate cu rol în ghidarea produșilor de secreție.

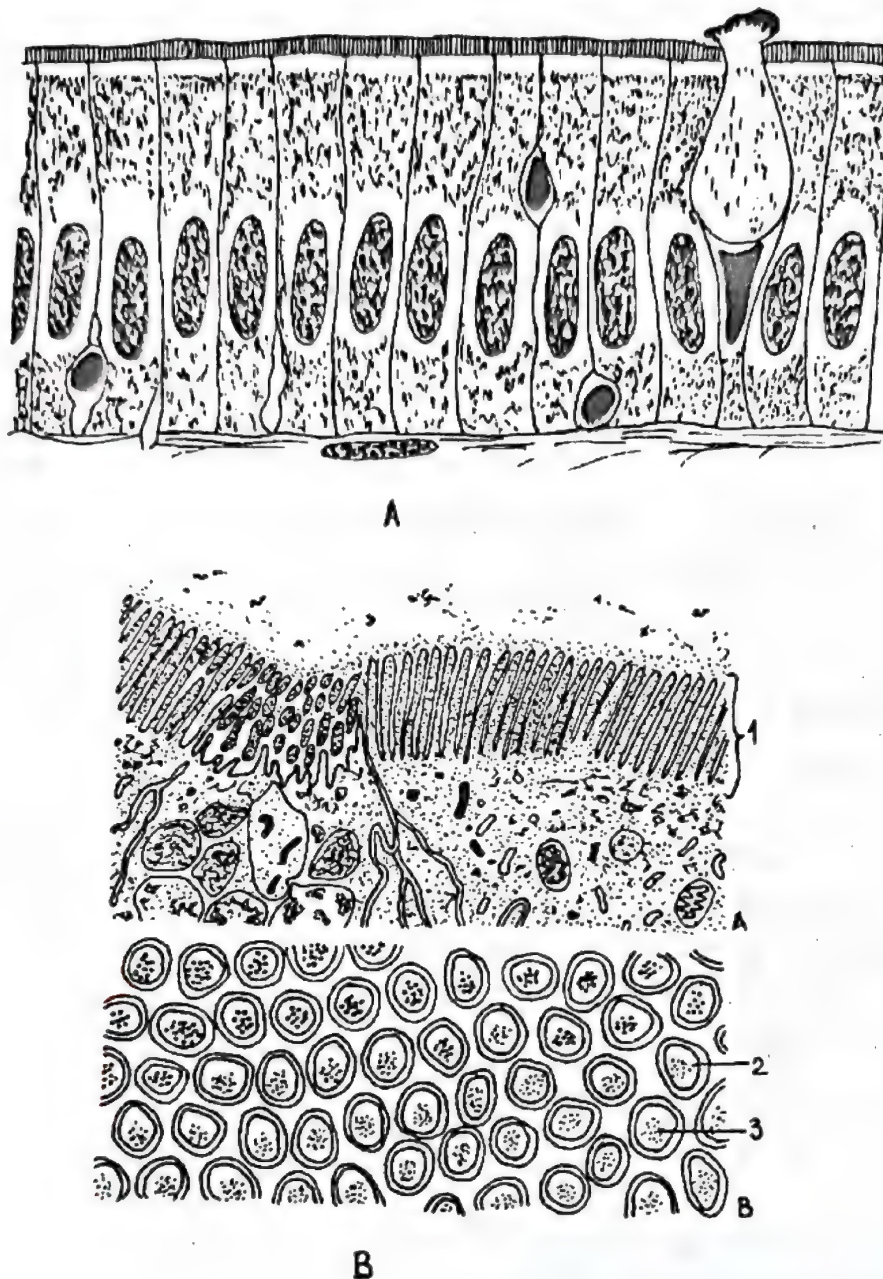


Fig.36. Microvilii: A - în microscopia fonică; B - în microscopia electronică; A - secțiune longitudinală; B - secțiune transversală; 1 - microvili; 2 - plasmalemă; 3 - microfilamente.

7.7.1.2. **Cilii vibratili** sunt expansiuni citoplasmatic mobile delimitate de plasmalemă care prezintă mișcări de pendulare și ondulatorii. Se găsesc la polul apical al epiteliului căilor respiratorii superioare, trompă uterină, etc.

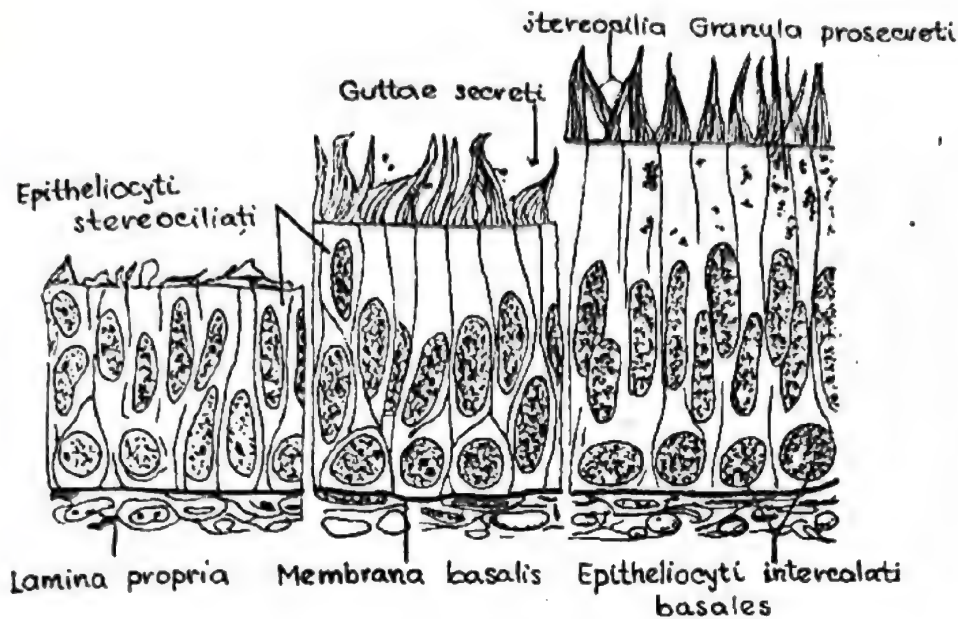


Fig. 37.
Stereociliile
epiteliului
epididimar în
microscopia
fonică.

La microscopul fonic apar sub forma unor prelungiri fine, perpendiculare pe suprafața apicală a epitelului mucoasei trompei uterine, La microscopul electronic cili vibratili sunt formați din patru zone:

1. *Tija cilului* are o lungime de 7 - 10 micrometri și un diametru de 0,5 micrometri. Ectoplasma evaginată acoperită de plasmalemă se diferențiază în două zone:

a. la periferie o zonă puțin densă la fluxul de electroni - hialoplasma;
b. centrul sau complexul filamentos axial (axonema) este format din citoplasmă în care se găsesc 10 perechi (dublete) de microtubi dispuși în două grupe:

- + 9 dublete periferice;
- + un dublet central.

2. *Zona de tranziție* prezintă o linie densă numită placă bazală traversată de cele 9 dublete periferice.

3. *Corpusculul bazal* sau kinetosomul are o formă cilindrică a cărei perete este format din 9 triplete de microtubi. Are rol în mișcarea ciliară.

4. *Rădăcina ciliară* are un aspect striat fiind alcătuită din pachete de microfilamente de actină paralele, perpendiculare pe microtubi, care alternează cu zone clare la fluxul de electroni.

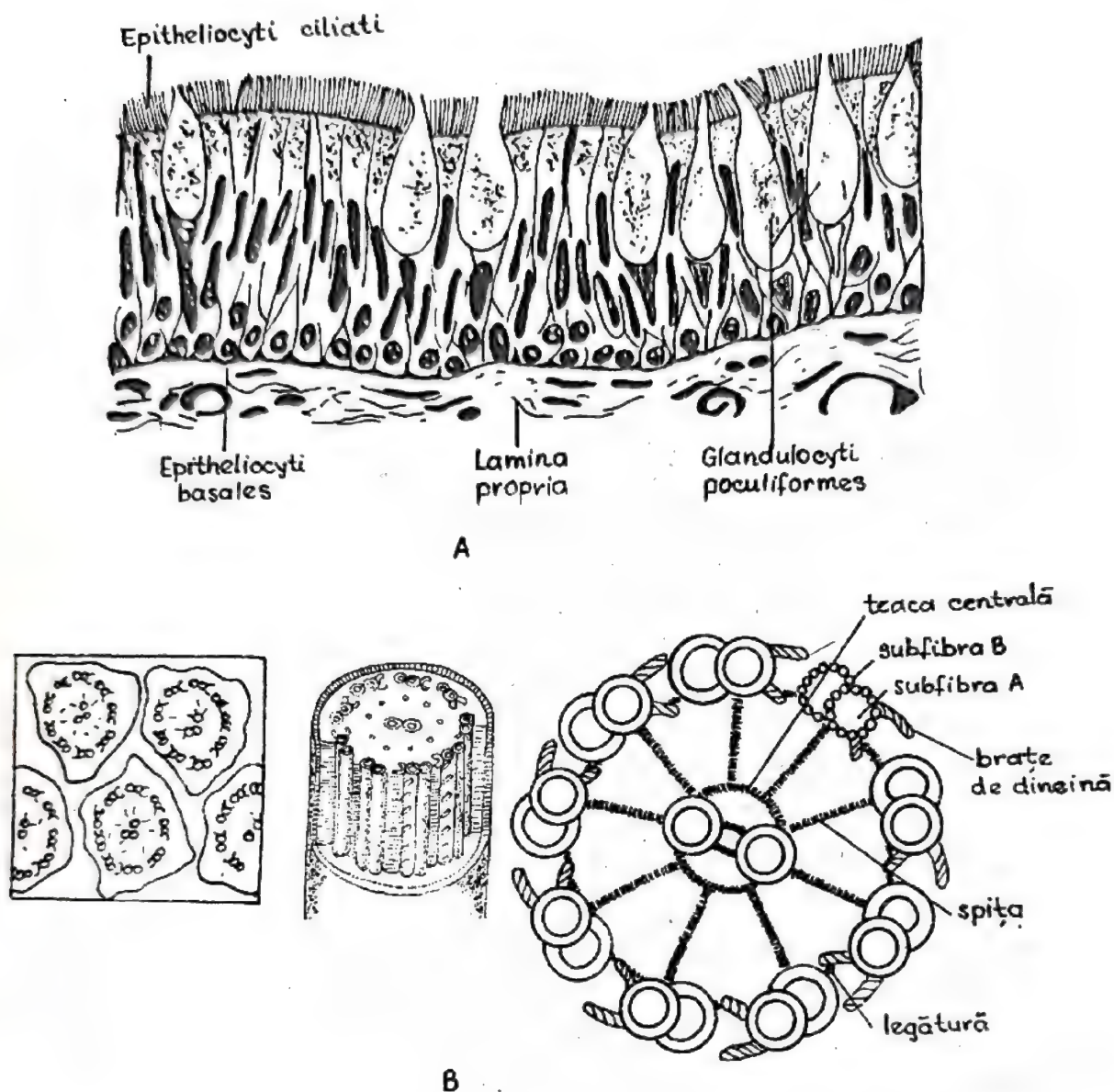


Fig. 38 Cilia vibratili; A - microscopia fonică (celule epiteliale ale mucoasei traheale); B - ultrastructura cilului vibratil în microscopia electronică.

7.7.2. Specializările plasmalemei polului bazal

La unele tipuri de celule epiteliale plasmalema polului bazal care joacă rol în transportul activ al substanțelor se învaginează mai mult sau mai puțin profund în citoplasmă pe care o fragmentează în compartimente mai mult sau mai puțin numeroase, aspect cunoscut sub numele de labirint bazal.



Fig. 39. Aspectul electron microscopic al labirintului bazal: mp. - membrana plasmatică; m. - mitocondrii; reg. - reticul endoplasmatic granular.

Nefrocitele tubului contort distal prezintă un labirint bazal bine reprezentat, în citoplasma căruia se găsesc numeroase mitocondrii.

7.7.3. Zonele de cuplaj celular

Celulele care intră în alcătuirea organismelor pluricelulare stabilesc între ele legături prin intermediul suprafețelor lor; acestea îndeplinesc anumite roluri în cadrul relațiilor intercelulare, fiecare din ele având unele particularități structurale și funcționale.

După structura lor morfofuncțională acestor zone numite și joncțiuni celulare li se disting trei varietăți:

- + joncțiuni de adezivitate;
- + joncțiuni impermeabile;
- + joncțiuni de comunicare.

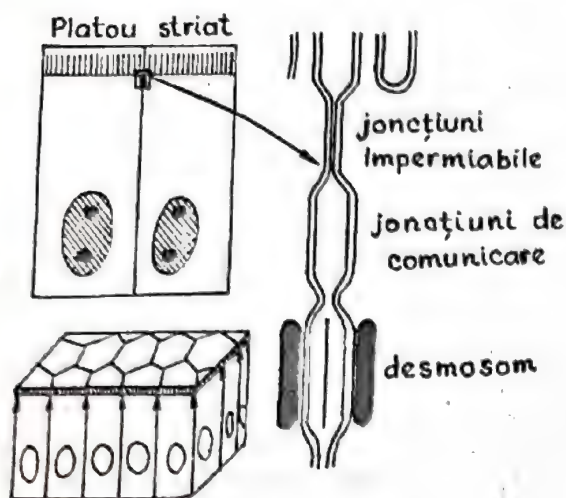


Fig.40. Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de joncțiuni celulare.

7.7.3.1. Joncțiuni de adezivitate (desmozomii sau maculae adherens) mențin în contact celulele supuse la forțe mecanice mari și se găsesc sub două forme:

a. desmozomii în bandă sau liniari întâlniți în zona latero-apicală a epiteliilor sunt formați din: aglomerări de microfilamente de actină dense la fluxul de electroni cu aspectul unei benzi intracitoplasmatică, cele două plasmaleme vecine și microfibrilele glicolixului care se întrepătrund.

b. desmozomii maculari au o formă ovalară (400 - 500 nm / 190 nm) la formarea cărora iau parte:

+ elemente extracelulare reprezentate de glicolemele celor două celule care se întrepătrund la mijlocul spațiului intercelular formând linia densă mediană sau lama centrală;

+ elemente celulare reprezentate de cele două plasmaleme cu foițele interne îngroșate, plăcile citoplasmatică cu aspect lamelar, tonofilamentele și microfilamentele de actină care unesc cele două plăci citoplasmatică, străbătând plasmalemele și spațiul intercelular.

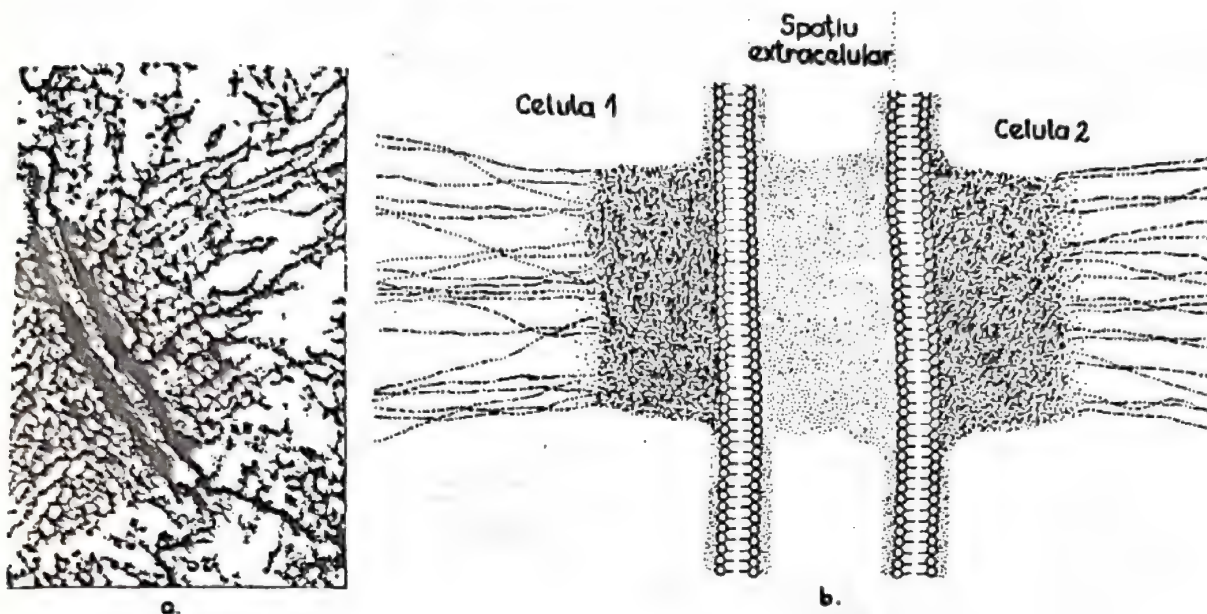


Fig.41. Reprezentarea schematică a unui desmozom.

c. hemidesmozomii sau desmozomii monocelulari sunt joncțiuni de adezivitate între polul bazal al celulei și membrana bazală; în structura lor intră aceleași elemente celulare ca și la desmozomul macular iar ca elemente extracelulare glicoalixul și fibrilele de ancoraj ale membranei bazale.

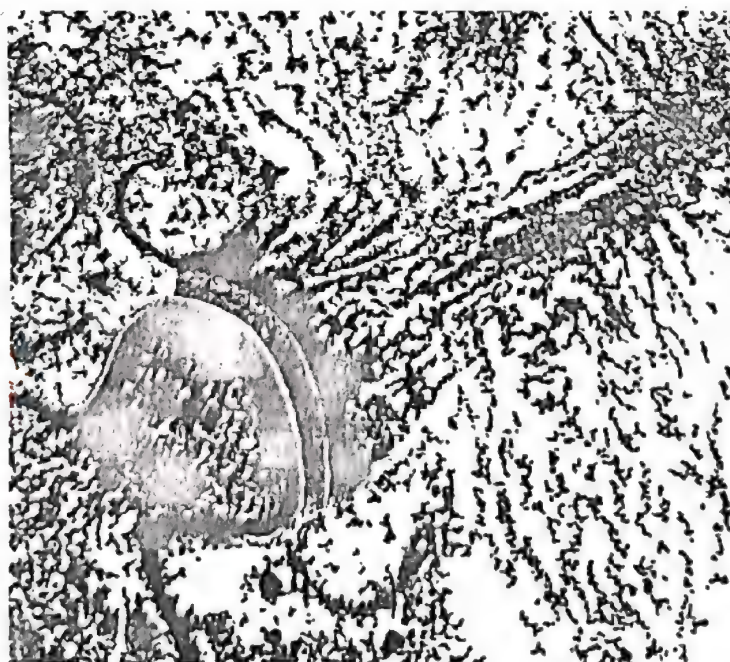


Fig.42. Reprezentarea schematică a unui hemidesmozom.

7.7.3.2. Joncțiunile impermeabile (etanșe sau zonula ocludens) sunt regiuni specializate ale plasmalemelor în care foițele lor externe se sudează prin intermediul proteinelor joncționale din structura celor două membrane, obturând complet spațiul intercelular.

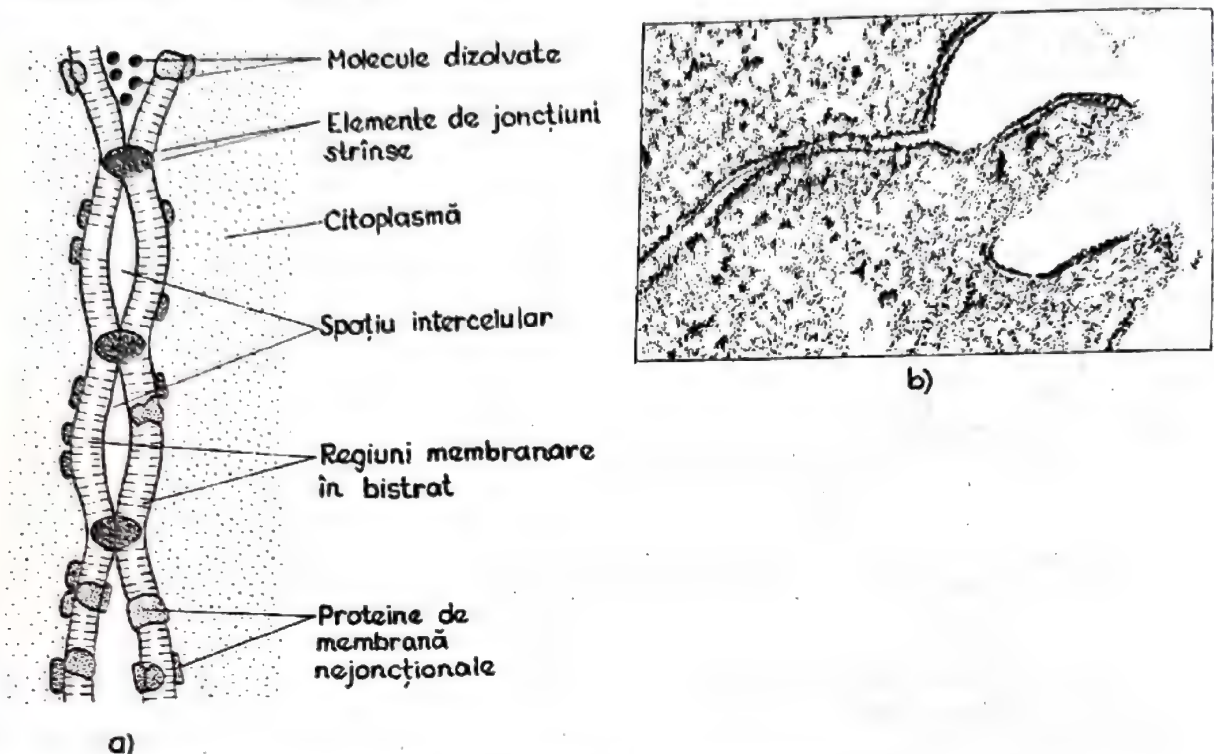
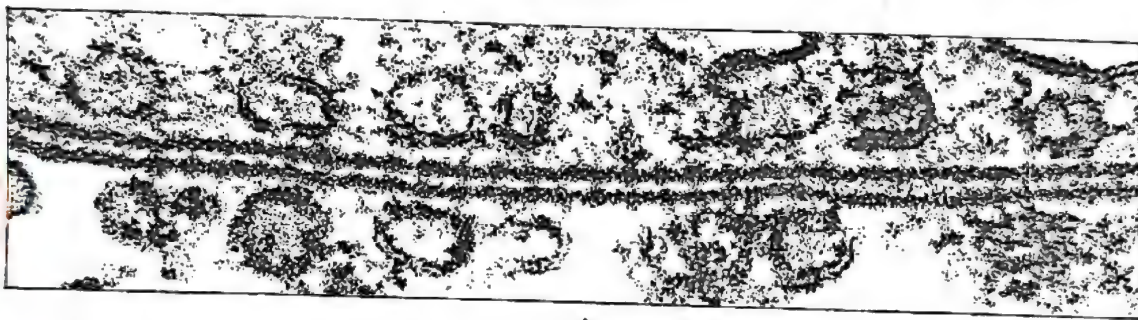
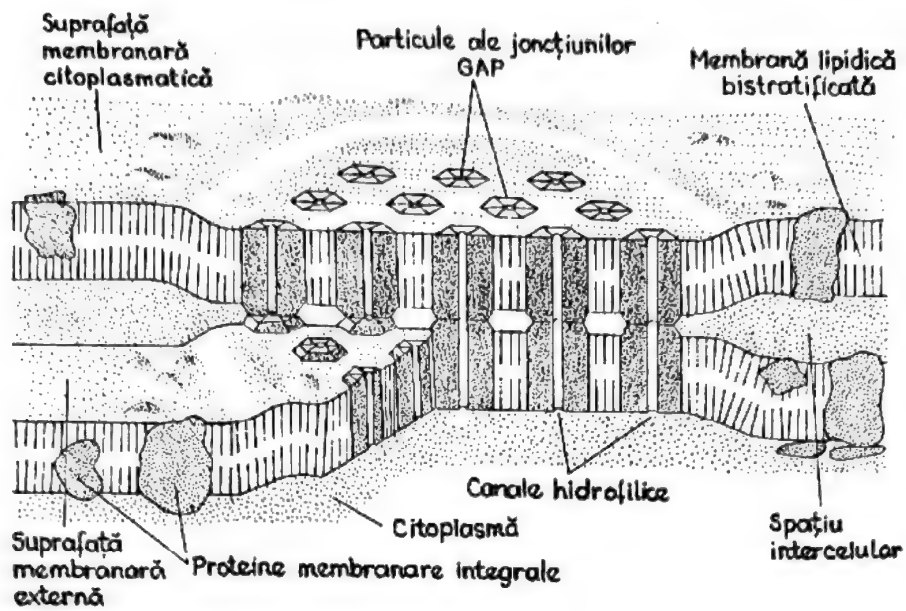


Fig.43. Reprezentarea schematică a unei joncțiuni impermeabile.

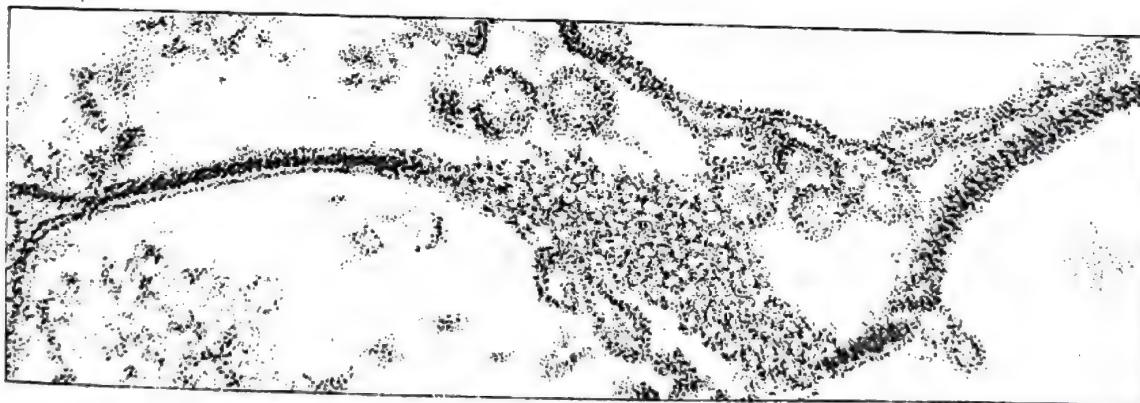
La microscopul electronic au un aspect pentalamelar și se găsesc la toate epitelile care delimitează o cavitate (epiteliul intestinal, glandular, nefrocite, hepatocite) precum și la endoteliile din anumite teritorii (celulele endoteliale din creier care participă la formarea barierei hematoencefalice).

7.7.3.3. Joncțiunile de comunicare (maculae communicans), permit trecerea unor molecule mici dintr-o celulă în alta; la nivelul lor plasmalemele celor două celule se apropie micșorând foarte mult spațiul intercelular (2 - 3 nm). Între cele două plasmaleme se găsesc niște canale delimitate de structuri proteice complexe (conexoni) prin intermediul cărora se realizează comunicarea intercelulară.

La microscopul electronic au un aspect heptalamelar și apar între celulele embrionare în faza de morulă dispărând sau restrângându-se la celulele diferențiate, la sinapsele electrice, la nivelul discurilor intercalare, la celulele musculare netede, etc.



a)



b)

Fig.44. Reprezentarea schematică a unei joncțiuni gap (A);
aspect ultrastructural (B)

7.7.3.4. **Interdigitațiile** reprezintă un aspect particular de cuplaj celular; plasmalemele au un contur sinuos angrenându-se una cu cealaltă

după modelul roților dințate.

Interdigitațiile reprezintă o rezervă de suprafață celulară utilizabilă în cazul expansiunii cavităților pe care le delimitează (epiteliul vaginal).



VIII. STUDIUL NUCLEULUI ÎN INTERFAZĂ

8.1. DATE GENERALE

Prin definiție, nucleul este o structură intracitoplasmatică limitat de învelișul nuclear. Prezența sa este caracteristică celulelor eucariote (cu excepția hematiilor adulte).

Nucleul este locul unde se află memoria genetică necesară vieții și proceselor de diferențiere și de multiplicare celulară. Expresia organizării fundamentale a materiei vii o reprezintă legătura strânsă dintre A.D.N. - ul nuclear și citoplasmă.

Într-un ciclu celular, nucleului i se descriu două stări morfofuncționale:

- a. starea metabolică (interfazică) în care se desfășoară procese de sinteză care pregătesc diviziunea celulară;
- b. starea mitotică.

8.2. FORMA ȘI POZIȚIA NUCLEULUI

În mod obișnuit forma nucleilor este asemănătoare cu cea a celulelor în care se găsesc. Ei pot fi:

1. *sferici* în celule sferice (ovocit), cubice (tireocit), etc.
2. *ovalară* în celule prismatice ale epiteliului intestinal, etc.
3. *bastonaș sau fusiform* în celulele musculare striate, etc.
4. *polilobat* în leucocite mature (granulocitele au nucleii formați din 2-5 lobi uniți prin punți subțiri).

Conturul nuclear depinde de starea funcțională a celulei, este neregulat în celulele secretorii aflate în plin proces de sinteză sau în fibrele musculare aflate în contracție.

În general, nucleul ocupă o poziție centrală, poziție care poate fi modificată de anumiți factori:

+ acumularea de granule de secreție (în celulele glandulare cu secreție exocrină nucleul este dispus bazal);

+ acumularea de substanțe de rezervă (în adipocit nucleul este împins la periferia celulei și capătă formă de disc).

8.3. DIMENSIUNILE NUCLEILOR

Talia și volumul nuclear variază de la un tip de celulă la altul în funcție de specie și de vârstă, cu fazele ciclului celular.

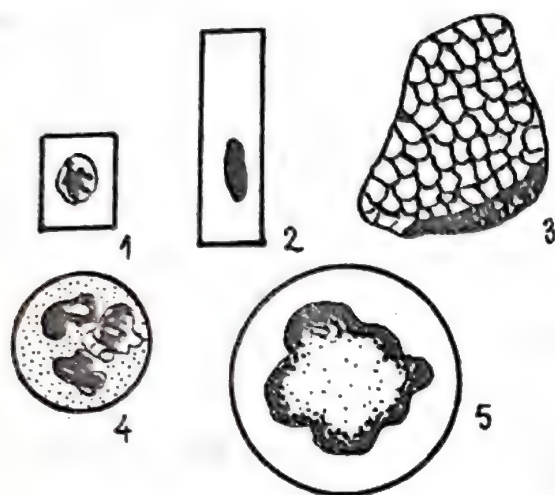


Fig.45. Diferite forme de nucleu. 1-sferic-celulă cubică; 2-ovalar-celulă prismatică; 3-turtit-celulă grasă; 4-lobat-polimorfonuclear.

Dimensiunile la specia umană variază în general în limite foarte largi: 3 - 25 micrometri. În celulele granulare din scoarța cerebeloasă diametrul nucleului nu depășește 2 - 3 micrometri, nucleul spermatozoidului are 4 micrometri iar ovulul are un nucleu de 20 - 25 micrometri.

O importanță deosebită se acordă raportului nucleocitoplasmatic (N/P) a cărui valori normale sunt cuprinse între 1/3 și 1/20. Acest raport este cu atât mai mare cu cât celula este mai tânără, mai activă (celulele embrionare) și invers la celulele adulte în repaus, îmbătrânite. El poate fi calculat cu ajutorul indicelui nucleoplasmatic.

$$NP = \frac{v_n}{v_c - v_n} = 1/3 - 1/20$$

v_n = volumul nuclear; v_c = volumul celulei

În cazul în care volumul celulei crește mai mult decât volumul nucleului, raportul nucleoplasmatic se va reface printr-o diviziune celulară sau printr-o creștere a volumului nuclear.

8.4. NUMĂRUL NUCLEILOR

Marea majoritate a celulelor organismului uman au un singur nucleu - mononucleate. Fac excepție eritrocitele adulte care au pierdut nucleul în

vederea adaptării la funcția de transport al oxigenului - **anucleate**.

La unele tipuri celulare cu activitate mai intensă există doi nuclei - **binucleate** - ca de exemplu în unii neuroni din ganglionii simpatici, în hepatocite.

Unele celule conțin în citoplasma lor mai mulți nuclei - **multinucleate** - ca de exemplu osteoclastul, etc. După modul lor de formare, celulele **multinucleate** se clasifică în plasmodii și sinciții.

+ **plasmodiul** provine dintr-o celulă inițial mononucleată în care au loc mai multe diviziuni celulare neînsoțite însă și de citodiereză (celula musculară striată, osteoclastul);

+ **sincițiul** rezultă din contopirea mai multor celule mononucleate într-o formă comună (sincițiul trofoblastic de la suprafața vilozităților placentare).

Creșterea numărului de nuclei într-o celulă poate fi corelată cu o creștere a activității metabolice (hepatocit) sau cu o necesitate a creșterii informației genetice în vederea sintezei proteinelor (celula musculară striată).;

8.5. STRUCTURA MORFOLOGICĂ A NUCLEULUI

Atât în microscopia fonică cât și în cea electronică nucleul apare format din: înveliș nuclear, cromatină, nucleoli și nucleoplasma.

8.5.1. *În microscopia fonică cu contrast de fază* nucleul interfazic în celula vie apare sub forma unui mic organit, vezicular, omogen, mai refringent decât citoplasma înconjurătoare. La exterior este delimitat de o membrană extensibilă, refringentă, fină dar bine vizibilă. În interior se observă 1 - 2 corpusculi foarte refringenți - nucleolii. Se pot observa mișcările nucleolilor în carioplasmă și a nucleilor în citoplasmă.

Examinarea la microscopul fonic obișnuit a preparatelor fixate și colorate cu hematoxină - eozina, evidențiază o structură nucleară mai complexă:

+ **membrana nucleară** apare sub forma unei linii fine care separă conținutul nuclear de cel citoplasmic (ceea ce se consideră a fi membrană nucleară nu este altceva decât o condensare periferică a cromatinei numită **membrană cromatică**);

+ o rețea filamentoasă și granulară constituind cromatina; se distinge o **eucromatină** care corespunde regiunilor slab colorate cu hematoxină și o **heterocromatină** intens bazofilă sub forma unor granule mai mari sau mai mici;



Fig.46 .Diferite aspecte ale cromatinei. 1 - cromatină fin granulară, eucromatină; 2 - cromatină în bulgări, heterocromatină; 3 - cromatină în rețea.

+ unul sau doi corpusculi sferici, foarte bazofili reprezentând nucleolii;

+ cromatina și nucleolii se găsesc în sucul nuclear sau nucleoplasma, clară și omogenă.

Prin utilizarea colorării cu o soluție de thionină la p.H 5,7 se poate pune în evidență prezența în nucleii celulelor somatice de la femeie a unui corpuscul colorat în bleu închis, de formă discoidală atașat membranei nucleare sau semilunară arăsat de nucleol, numit **corpusculul Barr** reprezentând condensarea interfazică a unui gonosom (cromozom sexual) X.

În 1970, Person, utilizând tehnica cu fluorocrom pentru identificarea cromozomilor a pus în evidență în nucleii celulelor somatice de la bărbații normali, a unui corpuscul numit F, corespunzând condensării interfazice a gonosomului Y.

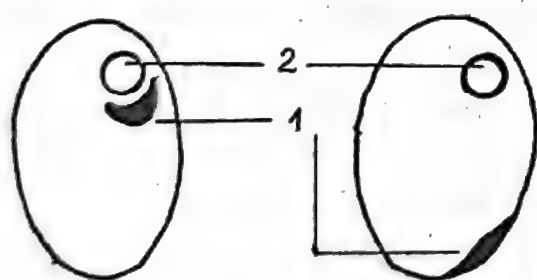


Fig.47. Localizările cromatinei sexuale; 1 - corpusculul Barr; 2 - nucleolul.

Reacția citochimică Brachet (verde de metil - pyronină) colorează cromatina în verde (A.D.N. - ul) iar nucleolul în roșu (A.R.N.).

8.5.2. În microscopia electronică

8.5.2.1. **Învelișul nuclear** apare constituit din două membrane trilamelate separate printr-un spațiu clar - **cisterna sau spațiul perinuclear** cu o grosime de 10-15 nm; cele două foițe, **internă și externă** au o grosime de 7,5 - 10 nm.

Membrana externă se continuă cu membranele reticulului

endoplasmatic granular (R.E.G.) și pe fața citoplasmatică are atașați ribozomi.

În numeroase puncte învelișul nuclear este străbătut de canale - **porii nucleari** - prin care se realizează pasajul macromolecular - nivel la care membrana externă se continuă cu cea internă.

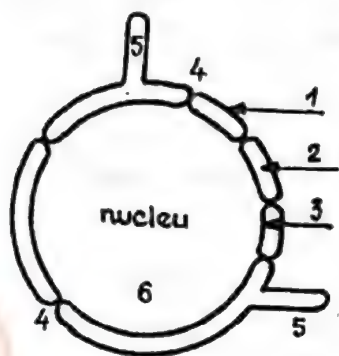


Fig.48. Reprezentarea schematică a învelișului nuclear. 1-membrana externă; 2-cisterna perinucleară; 3-membrana internă; 4-porii nucleari; 5-reticul endoplasmatic; 6-spațiul intranuclear.

La microscopul electronic (TEM) cu înaltă rezoluție porii nucleari apar ca structuri complexe formați din:

- + **materialul inelar** reprezentat de 16 particule sferice dispuse câte 8 pe conturul fiecărei deschideri a porului, dându-i o formă octogonală (granule inelare).

- + **diafragma** sub forma unor conuri de material dens, amorf, care se inseră pe conturul porului și se dirijează către centru;

- + **granula centrală**, inconstantă, ocupă centrul porului;

- + **materialul fibrilar** este format din 8 pachete de microfilamente care se inseră pe granulele inelare interne dirijându-se către interiorul nucleului.

Prin intermediul porilor se realizează schimburile nucleoplasmice de macromolecule.

Lamina densă internă cu o grosime de 20 - 60 nm este o zonă fin granulară sau fibrilară situată pe fața endonucleară a membranei interne (întreruptă la nivelul porilor) cu rol de suport mecanic.

Lamelele inelare sunt formate din membrane perechi dispuse concentric, în citoplasmă și în fața porilor; ele sunt prezente în special în celulele care cresc și se diferențiază rapid (celula embrionară). Aceste două ultime formațiuni sunt cunoscute sub numele de structuri asociate învelișului nuclear.

8.5.2.2. **Cromatina** se prezintă ca un agregat heterogen de granule și filamente fine, condensate uneori sub forma unor granule mai mari sau

cromecentre.

Heterocromatina corespunde unei forme condensate localizată la periferia (membrana cromatică) sau în interiorul nucleului;

Eucromatina corespunde unei forme dispersate, fin granulare situată între cromocentre; este cromatina biologic activă. La microscopul electronic (TEM) de înaltă rezoluție se poate observa că unitatea structurală a cromatinei este fibra cromatiniană cu aspectul unui șirag de mătănii - nucleosomi - alcătuită din A.D.N. și histone.

8.5.2.3. **Nucleolul** este un component al nucleului interfazic cu rol în sinteza A.R.N.-ului ribosomal, care dispare în timpul mitozei. Raportul dintre volumul nucleului și nucleolului (N/n) se modifică în favoarea nucleolilor în cazul în care celula devine hiperactivă (în perioada sintezei proteinelor de structură sau a proteinelor metabolice).

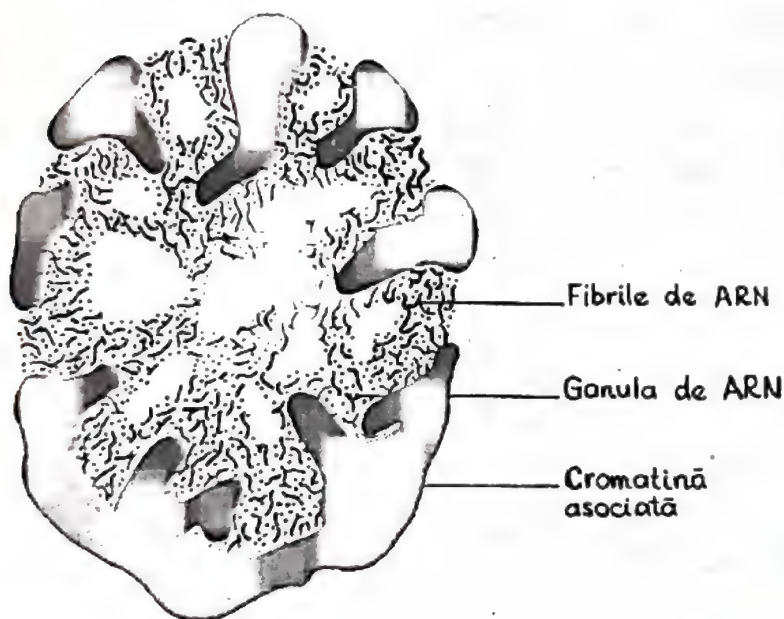


Fig.49. Ultrastructura nucleolului.

Din punct de vedere ultrastructural, nucleolul este format din:

- + **componenta fibrilară** alcătuită din filamente grupate în pachete;
- + **componenta granulară** este structura cea mai bine reprezentată, este alcătuită din granule cu diametrul de 15nm;
- + **componenta cromosomală** formată din fibre cromatinene dispuse în special la periferia nucleolului;
- + **matricea** sau componenta astructurată, umple spațiile dintre primele trei structuri nucleolare.

8.5.2.4. **Spațiile intercromatinene** delimitate de cele trei

componente ale nucleului (înveliș nuclear, cromatină și nucleol) pot conține următoarele ultrastructuri.

- + **fibrile pericromatice** cu un diametru de 3 - 5 nm dispune la periferia cromatinei (precursor al A.R.N. m.).

- + **granule pericromatice** cu un diametru de 25 - 40 nm (A.R.N.m + A.R.N.r 40S);

- + **granule intercromatice** cu un diametru de 20 nm (A.R.N.m. mascat de proteine);

- + **corpui spiralați** sunt agregate sferice de 0,3 - 0,5 microni formați din fibre spiralate de ribonucleoproteine al căror rol este încă neclar.

8.6. STRUCTURA BIOCHIMICĂ A NUCLEULUI

Membranele învelișului nuclear au aceeași structură ca și celelalte endomembrane. Cromatina este un complex nucleoproteic bogat în A.D.N.; nucleolul conține A.R.N. și A.D.N.

Nucleoplasma conține A.R.N., proteine bazice (histone), proteine acide, A.T.P. și enzime necesare autoreplicării și transcripției.

IX. ORGANITELE SINTEZEI ȘI SECREȚIEI CELULARE

Sintezele celulare se derulează la nivelul citoplasmei sub controlul A.D.N.-ului nuclear. Procesele de sinteză și secreție se desfășoară la nivelul următoarelor organele celulare: ribosomii, reticulul endoplasmatic și complexul Golgi.

9.1. RIBOSOMII

Ribosomii sau corpusculii lui Palade (1953) sunt organele nemembranare submicroscopice formate din ribonucleoproteine (A.R.N.r.) cu rol în procesele de proteogeneză.

Sunt prezenți în citoplasma tuturor tipurilor celulare sub formă liberă (izolați sau grupați în structuri poliribosomice), sau **atașați** membranelor reticulului endoplasmatic și de fața citoplasmatică a învelișului nuclear.

La **microscopul fonic**, datorită dimensiunilor mici situate sub limita puterii de rezoluție, ribosomii nu pot fi observați; în celulele în care au loc intense procese de proteogeneză (celulele foliculare din ovar) ribosomii formează zone intens bazofile în citoplasmă. Prin tehnica citochimică Brachet (verde metil pironină), ribosomii se colorează în roșu, reacție care indică prezența A.R.N.-ului.

La **microscopul electronic** (TEM) ei apar sub forma unor granule ovalare sau elipsoidale cu diametrul mare de 20-30nm și cel mic de 16-17nm, cu un coeficient de sedimentare la eucariote de 80 S (Svedberg).

Tehnica colorării negative pune în evidență un șanț care imparte acest organit în două subunități inegale ca dimensiuni și cu structură morfologică și biochimică diferită.

+ **subunitate mică** cu coeficientul de sedimentare de 40 S și

+ **subunitate mare** de 60 S prevăzută cu un canal prin care trece lanțul peptidic sintetizat.

Polisomii sau poliribosomii sunt formațiuni constituite dintr-o moleculă de A.R.N. mesager pe care se fixează mai mulți ribosomi (ce vor fi cu atât mai numeroși cu cât proteina ce trebuie sintetizată va fi mai mare).

Poliribosomii liberi sintetizează proteine de structură iar cei atașați membranelor reticulului endoplasmatic sintetizează proteine de export.

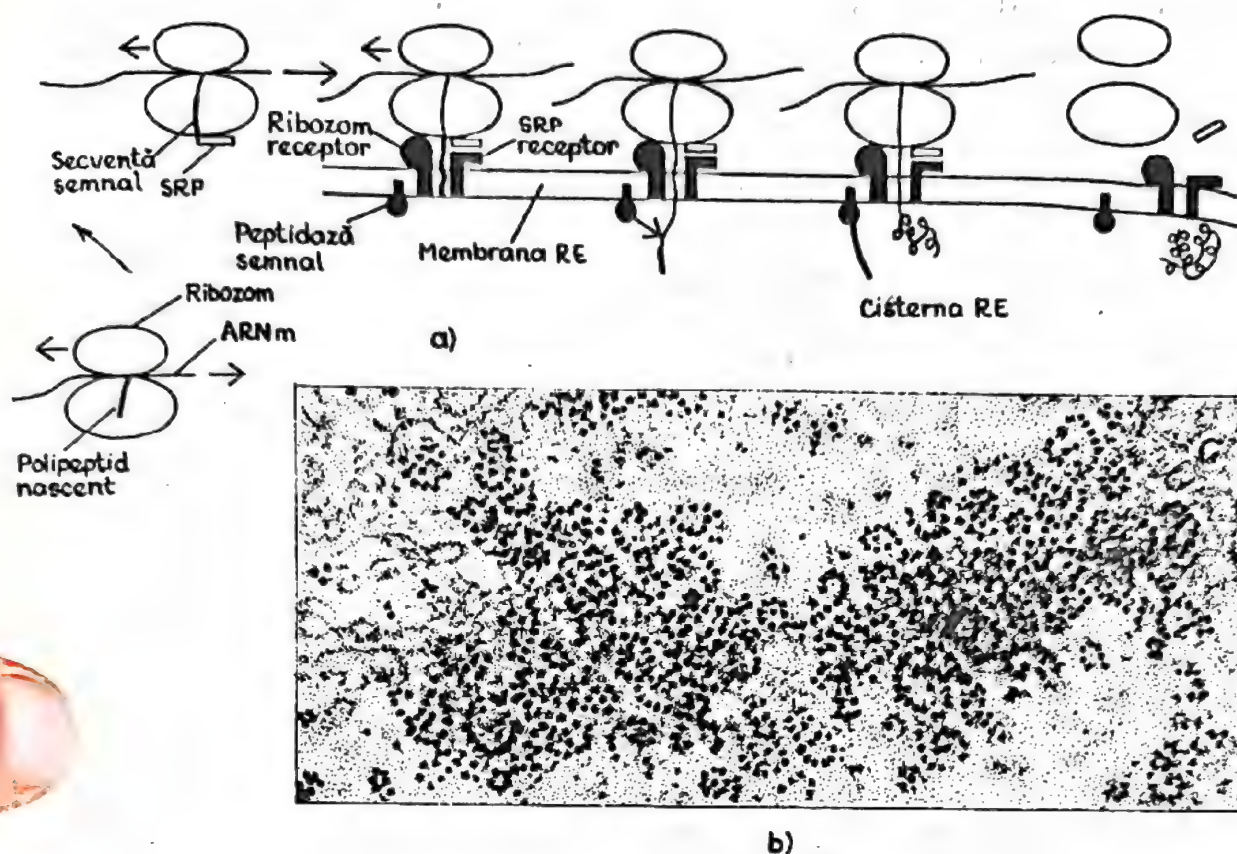


Fig.50. a-schema traducerii ribosomale și sinteza de proteine; b-poliribosomi.

9.2. RETICULUL ENDOPLASMATIC

Reticulul endoplasmatic este un organit membranar, comun tuturor celulelor, reprezentat sub forma unor canalicule și cisterne limitate de endomembranare trilamentate cu o grosime de 5-6nm. El îmbracă două forme care comunică una cu cealaltă dar diferă prin structură și funcții: reticulul endoplasmatic granular (rugos) și neted.

9.2.1. *Reticulul endoplasmatic granular* reprezintă ansamblul structurilor canaliculare și veziculare membranare, cu diametrul de 20 nm, pe suprafața cărora se găsesc ribosomii atașați prin subunitatea mare; la nivelul lui se sintetizează proteinele de export.

9.2.1.1. *Microscopia fonică*. R.E.G. este vizibil datorată prezenței ribosomilor (A.R.N.).

Pe preparate microscopice colorate cu hemalaun picro-indigo-carmin (culoare brună), tricromul lui Ramony Cajal (tentă roșie) metoda Mann-

Doninici (culoare bleu), R.E.G. se evidențiază bine în celulele glandulare (acinii pancreatici, etc.) unde ocupă o poziție bazală, care se dispun concentric formând corpii lui Berg, în celulele nervoase unde formează corpii lui Nissl (ergastoplasma vechilor autori).

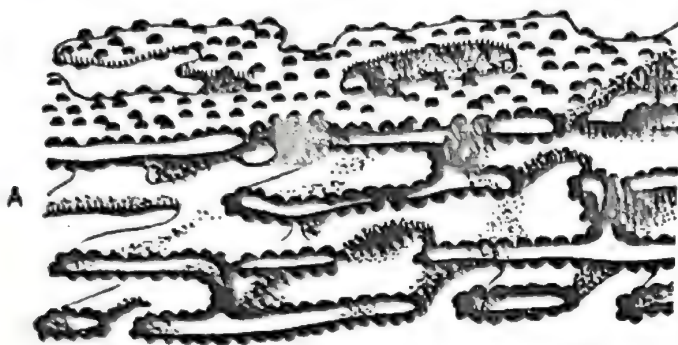


Fig.51. Reprezentarea schemei tridimensionale a reticulului endoplasmatic granular (A) și neted (B).

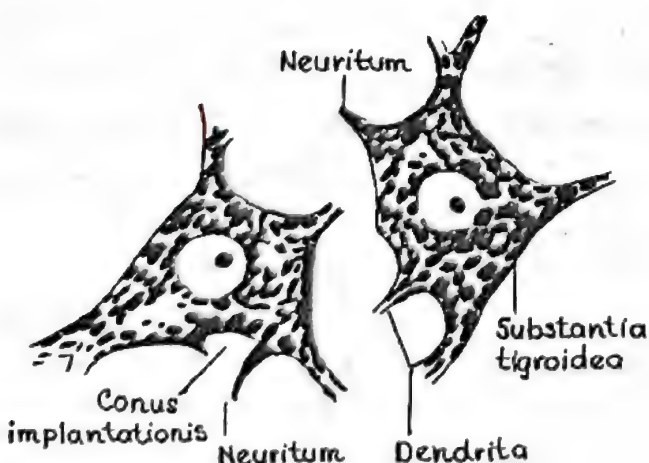
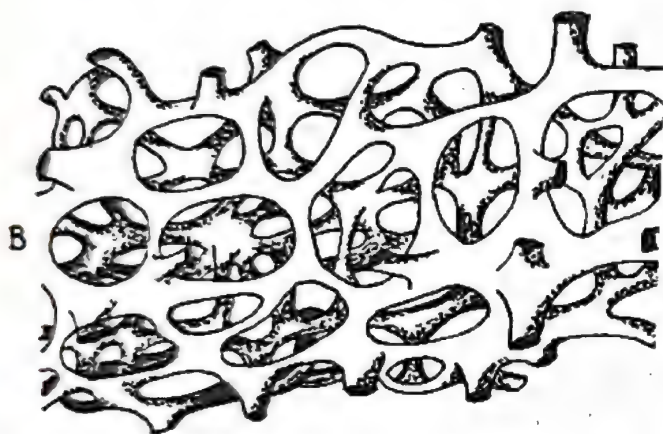


Fig.52. Reticulul endoplasmatic granular (corpusul Nissl - substanța tigroidă) în microscopia fonică.

9.2.1.2. În microscopia electronică (TEM) R.E.G. apare sub forma unor saci aplatizați sau vezicule a căror membrane trilamelate cu o grosime

de 5-6 nm delimitează un lumen de 5-60nm.

În raport de starea funcțională surprinsă, conținutul lumenului poate fi omogen și puțin dens la fluxul de electroni sau heterogen, cu aspect granular.

Pe unele preparate se poate observa continuitatea membranelor R.E.G. cu membrana externă a învelișului nuclear și a lumenului cu cisterna perinucleară.

Caracteristicile acestei forme de reticul endoplasmatic îl constituie prezența ribosomilor pe fața citoplasmatică a membranelor care-l delimitează.



Fig.53. Reticulul endoplasmatic granular în microscopia electronică.

9.2.2. Reticulul endoplasmatic neted (R.E.N.).

Reticulul endoplasmatic neted nu este vizibil pe preparate de microscopie fotonică. În microscopia electronică el apare sub forma unui labirint de canalicule interconectate care comunică cu sacii R.E.G.

Membranele R.E.N. au aceeași structură ca și a membranelor R.E.G. cu deosebirea că din loc în loc prezintă fenestrări asemănătoare porilor nucleari și pe ele nu se atasează ribosomi.

R.E.N. este mai bine reprezentat în celulele care sintetizează: hormoni steroizi (glanda suprarenală, celulele interstițiale din testicul și ovar), o mare cantitate de glicogen (hepatocitate, miocite) și în cele care produc pigmenți (melanocite).

În celula musculară striată, R.E.N. poartă numele de reticul sarcoplasmatic, cu rol de rezervor de Ca și A.T.P., participând la procesul de cuplare a excitației cu contracția.

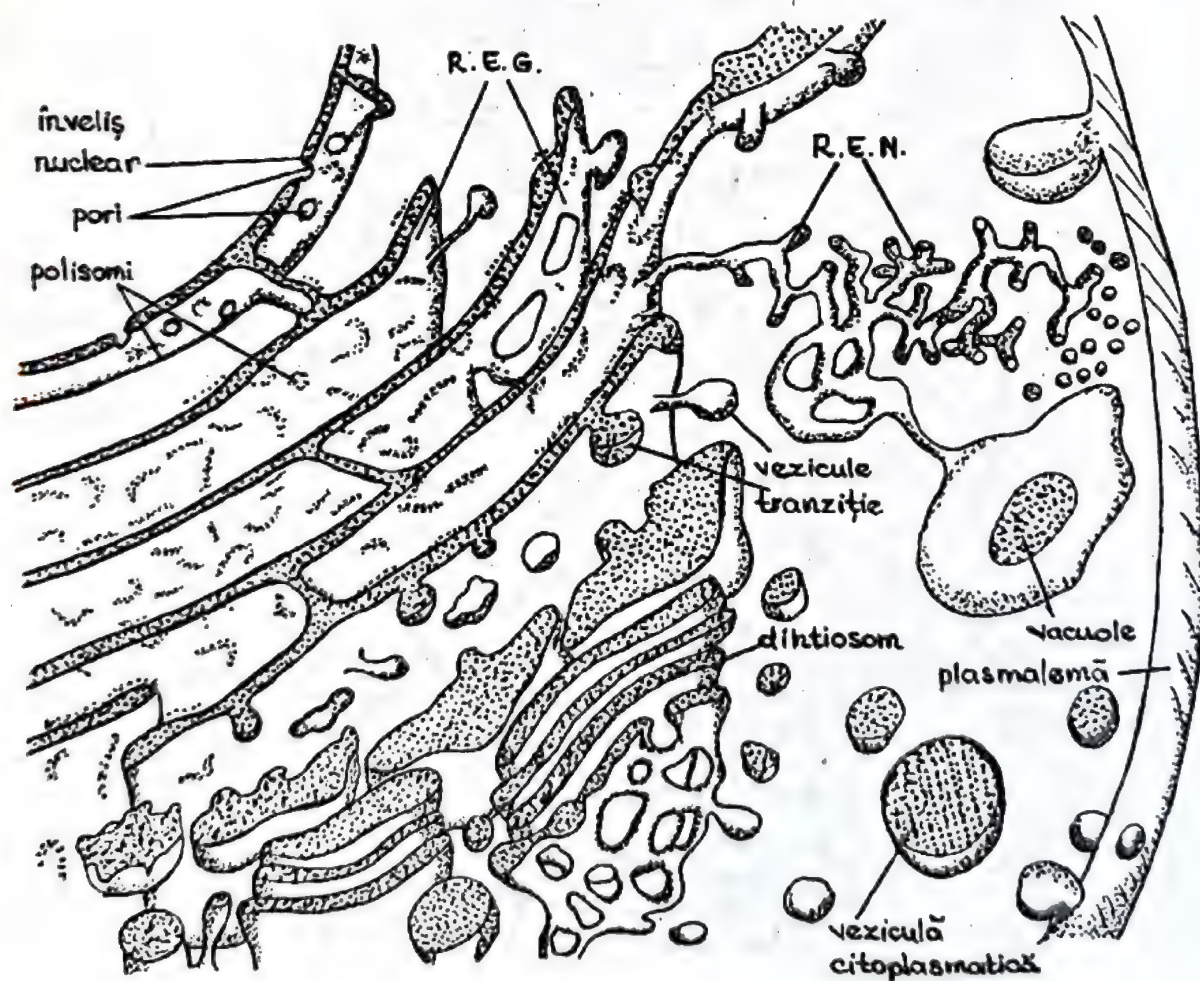


Fig.54. Sistemul endomembranar al celulei.

9.2.3. Structura moleculară

În afara elementelor de structură, R.E. conține multe enzime caracteristice acestui organit.

Majoritatea funcțiilor R.E. se realizează prin intervenția a două lanțuri transportoare de electroni reprezentate de două flavoproteine (NADH - citocrom - C - reductaza și NADH- citocrom b5 - reductaza) și două homoproteine (citocrom b5 și citocrom P - 450).

Alte enzime ale R.E. sunt: peptidazele, glicozil- transferazele și hidrolazele care modifică polipeptidele formate în R.E.G. Glucozo-6-fosfataza catalizează degradarea glicogenului din R.E.N.

9.3. COMPLEXUL GOLGI

Complexul Golgi este un sistem intracitoplasmatic de cavități limitate de citomembrane, cu suprafața netedă, prezent atât în celulele vegetale cât și animale.

9.3.1. Structura în microscopia fonică

Observarea vitală a complexului Golgi în celulele pancreatice de mamifare se poate realiza fără a recurge la microscopul cu contrast de fază sau interferențial, cu condiția utilizării unor obiective mari.

Pe preparatele permanente care conțin celulele specializate în sinteză și secreție (celule glandulare) obținute după prelucrarea cu tetraoxid de osmiu, cobalt, nitrat de argint (Bowen, da Fano, Elftman)- complexul Golgi colorat în negru apare sub forma unei rețele de filamente neregulate situate totdeauna în imediata vecinătate a nucleului.

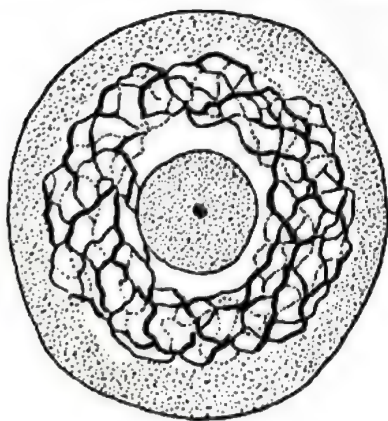


Fig.55. Complexul Golgi în microscopia fonică.

9.3.2. Structura în microscopia electronică

În microscopia electronică complexul Golgi apare sub forma unor unități structurale numite dihtiosomi alcătuite din cisterne aplatizate și vezicule de diferite mărimi, delimitate de membrane lipoproteice, trilamelate, de 6-8nm grosime.

1. *Sacii turtiți*, dilatați la extremități, se asociază câte 4-8, separați prin spații de 20nm și având o dispoziție paralelă. Fiecare ansamblu de saci golgieni este o structură polarizată prezentând două fețe.

a. o față proximală sau de formare, convexă, orientată către nucleu și R.E.

b. o față distală sau de maturare, concavă, orientată către zona de plasmalemă prin care se vor evacua produșii de secreție celulară.

2. *Microveziculele* cu un diametru de 20-60 nm și conținut heterogen, situate în vecinătatea feții de formare.

3. *Macroveziculele* cu un diametru de 60-200nm și conținut amorf sau granular, vin în raport cu fața de maturare a sacilor golgieni.

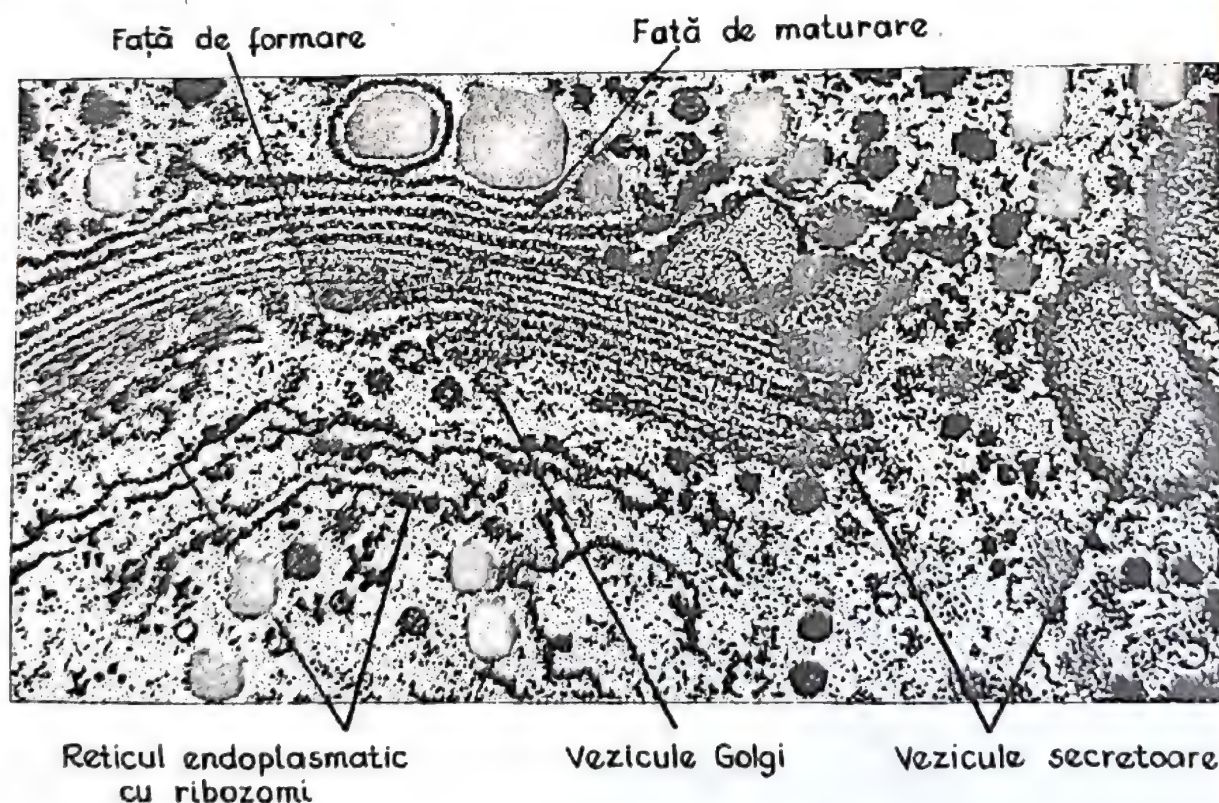


Fig.56. Complexul Golgi în microscopia electronică.

9.3.3. Structura moleculară

În afara elementelor de structură, fracțiunile Golgi au un echipament enzimatic bogat, din care tiamin - pirofosfataza (T.P.P.) și nucleozid - disfosfataza (N.D.P.) reprezintă marcatorii citoenzimologici ai acestui organit. S-au mai detectat sulfotransferaze, glicoziltransferaze, fosfataza acidă, etc.

Complexul Golgi are rol în concentrarea și transferul proteinelor, sinteza glicolipidelor și glicoproteinelor, în formarea și reciclarea membranelor.

X. ORGANITE GENERATOARE DE ENERGIE. MITOCONDRIILE.

Mitocondriile, organite membranare prezente în toate celulele cu metabolism aerob, conțin sisteme enzimatic necesare oxidării materialelor nutritive, sintezei moleculelor de A.T.P - și cuplajului acestor două procese - fosforilarea oxidativă. Mitocondria este "uzina de putere" care produce energia necesară derulării reacțiilor celulare. Sunt organite semiautonome.

10.1. MICROSCOPIA FOTONICĂ A MITOCONDRIILOR

A. *Microscopia fotonică cu contrast de fază*, mitocondriile apar foarte net în special după colorații supravitale cu verde Janus B, negru Janus, albastru de metil, etc.

Se poate constata că sunt dotate cu o mare plasticitate și o mobilitate cu totul deosebită: mitocondriile se deplasează în masa citoplasmatică, se deformează, dau muguri laterali care se pot detașa; diametrul și volumul lor poate crește sau micșora.

B. *Pe preparatele fixate și colorate cu fuxină acidă (tehnica Altman), violet cristal (tehnica Benda), cu lacurile de hematoxilină prin colorații regresive, impregnare argentică (tehnica Rio-Hortega), mitocondriile apar sub diverse forme, în funcție de tipul celular:*

- + alungită în celulele epiteliale ale pancreasului exocrin,
- + granulară în hepatocite, celulele glandei corticosuprarenale.

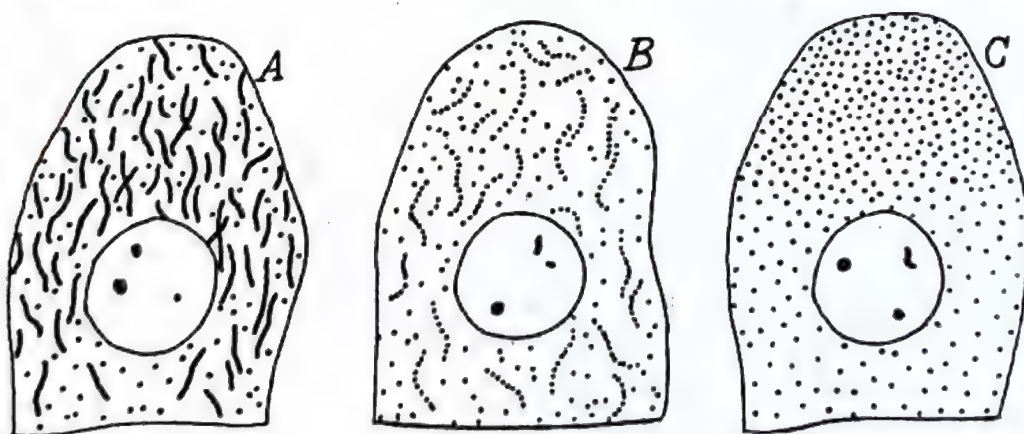


Fig.57. Diferite forme de mitocondrii în microscopia fotonică.

2. **Talia** mitocondriilor este diferită în raport de tipul celular. În hepatocite, nefrocite, ele au o lungime de aproximativ 3 microni și un diametru de 0,5 - 1 microni; în celulele musculare au o lungime care poate

ajunge la 8 microni iar în celulele epiteliale ale pancreasului exocrin 10 - 12 microni.

3. **Numărul** mitocondriilor dintr-o celulă variază în raport de necesitățile ei energetice; în hepatocite, nefrocite, numărul lor este mare (300 - 2500) față de adipocite, limfocite, etc. unde numărul lor este redus.

4. **Distribuția** lor în citoplasmă nu este fixă, ele migrând spre regiunile în care celula are mai multă nevoie de energie: perinuclear, în vecinătatea plasmalemei, lângă R.E.G.

În nefrocitele tubulilor contorți distali ele ocupă labirintul bazal, energia eliberată fiind utilizată de plasmalema polului bazal, în vederea efectuării unui transport activ de substanțe.

În celulele ciliate (epiteliul mucoasei trompei uterine) mitocondriile se găsesc în apropierea corpusculului bazal - centrul cinetic al cilului.

La nivelul celulelor cu dublă polaritate (hepatocite, enterocite) mitocondriile se aglomerează la cei doi poli.

10.2. ULTRASTRUCTURA MITOCONDRIILOR

La TEM, mitocondriile apar sub o formă sferică sau alungită, formate din două sisteme membranare, trilamelate: **membrana externă** și **membrana internă** care trimite în interior prelungiri digitiforme sau **creste mitocondriale**. Fiecare membrană are o grosime de 6 - 8 nm și structura lor este asemănătoare cu cea a altor citomembrane.

Spațiul dintre două membrane numit **camera externă** sau spațiul intermembranar este ocupat de un material amorf, puțin dens la fluxul de electroni.

Camera internă sau matricea mitocondrială, delimitată de membrana internă și compartimentată de crestele mitocondriale, este ocupată de un material fin granular în care se pot observa uneori granule cu un diametru de 3 - 5 nm (granule intramitocondriale care reprezintă locurile de fixare a cationilor bivalenți în special Ca^{2+} și Mg^{2+}); este mai densă la fluxul de electroni decât camera externă.

Prin tehnicile colorării negative s-a constatat că membrana internă este formată din particule elementare (F1) sau unități tripartite alcătuite din:

- + un **cap** sferic cu diametrul de 9 nm care pătrunde în matricea mitocondrială;

- + o **tijă** cilindrică cu lungimea de 5 nm și diametrul de 3,5 nm;

- + o **bază** patrulateră cu latura de 14 nm și grosimea de 4,5 - 5 nm.

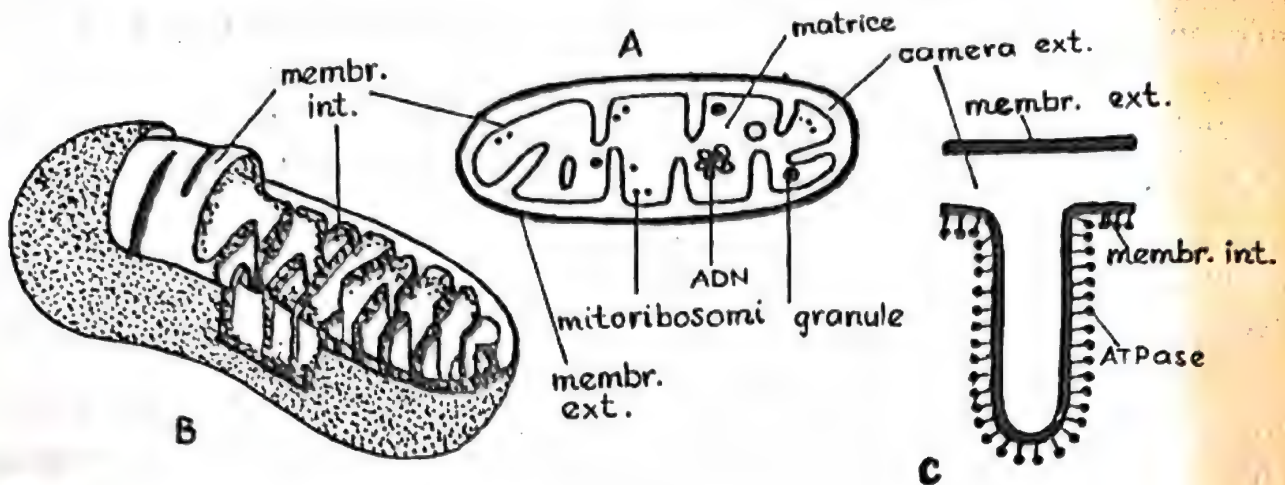


Fig. 58. Reprezentarea schematică a ultrastructurii mitocondriale.



Fig. 59. Ultrastructura mitocondriei.

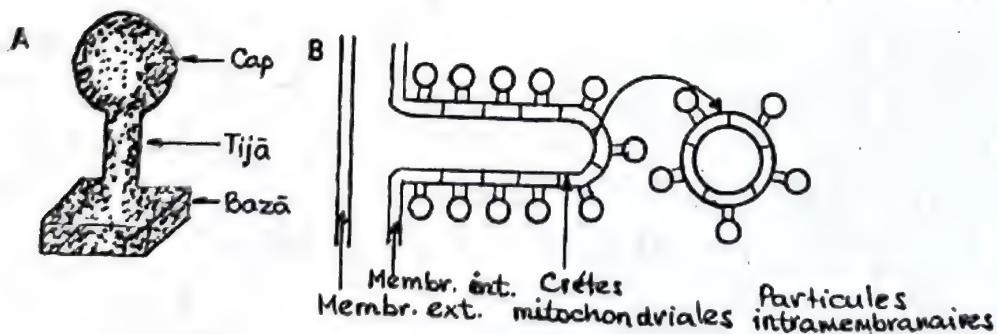


Fig. 60. Unitățile tripartite ale membranei interne mitocondriale.

10.3. STRUCTURA MOLECULARĂ

În afara elementelor de structură, mitocondriile conțin un bogat

echipament enzimatic. Dintre acestea:

- + **membrana externă** conține monoamin - oxidaza (marker);
- + **membrana internă** - enzime ale lanțului respirator (citocrom - C - oxidaza - marker) și ale fosforilării (F1 - A.T.P. - aza);

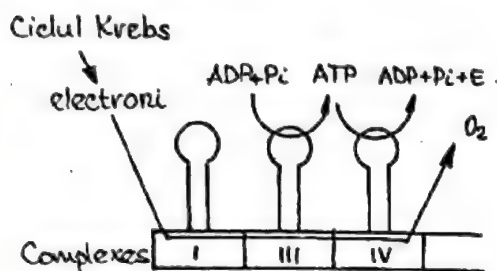


Fig.61. Funcțiile unității tripartite.

- + **camera externă** - adenilat - kinaza;
- + **camera internă** - conține enzimele solubile ale ciclului Krebs și cele implicate în oxidarea acizilor grași (malat - dehidrogenaza - enzimă marker).

În matricea mitocondrială se mai găsesc 4 - 5 molecule de A.D.N. mitocondrial cu structură bicatenară dispuse circular ca la bacterii, A.R.N. mitocondrial, enzime care catalizează reacțiile de autoreplicare, transcripție, proteogeneză și ioni de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , etc.

XI. ORGANITELE DIGESTIEI CELULARE

Prin digestie celulară se înțelege ansamblul reacțiilor de digerare a moleculelor pătrunse în celulă prin endocitoză, a unor fragmente de celulă sau a unor structuri tisulare.

Celulele eucariote sunt înzestrate cu organite membranare - lizosomii și peroxizomii - a căror funcție principală este digestia intra și extracelulară.

11.1. LIZOSOMII

Lizosomii sunt organite membranare comune tuturor celulelor care se observă numai în microscopia electronică (cu excepția lizosomilor de talie mare 0,3 - 1 microni din leucocitele polimorfonucleare care sunt vizibili și în microscopia fonică).

Au o formă sferică iar conținutul este bogat în enzime hidrolazice.

11.1.1. Structura electronomicroscopică

La microscopul electronic (T.E.M.) lizosomilor li se descriu:

- a. *membrana* trilamelată, cu o grosime de 6 - 8 nm;
- b. *matricea* sau miezul lizosomilor poate îmbrăca aspecte diferite; la unii miezul este omogen, fin granular (lizosomi primari) la alții matricea conține fragmente de membrane, microbii, etc. (lizosomi secundari).

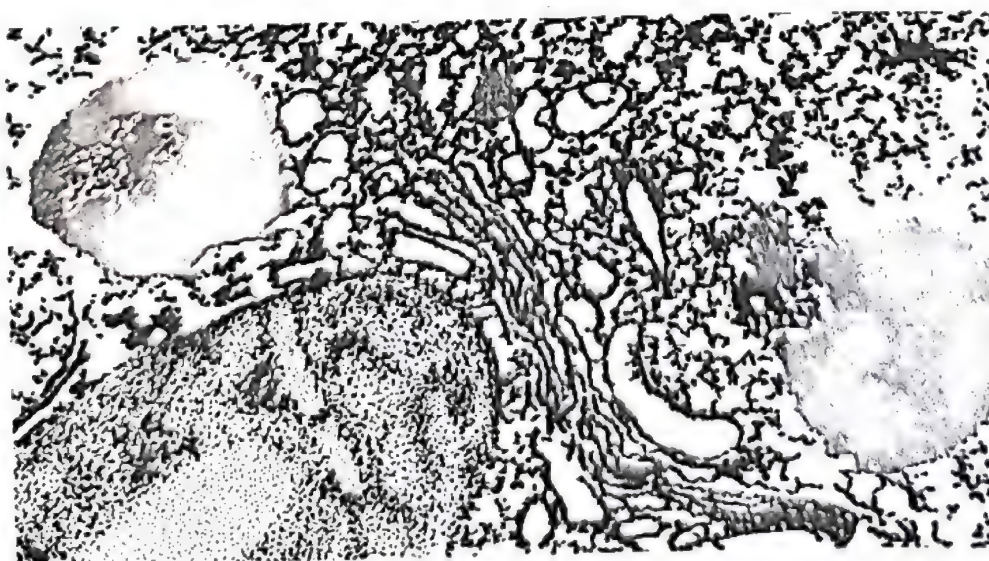


Fig.62. Lizosomii în microscopia electronică.

După natura materialului înglobat, lizosomii secundari se clasifică în:

1. *heterolizosomi* - rezultă din fuzionarea lizosomilor primari cu fagosomii sau pinosomii (heterofagie);

2. *autolizosomi* - se formează prin fuziunea lizosomilor primari cu vacuole care conțin structuri proprii uzate (resturi endomembrane); procesul digestiv se numește autofagie;

3. *crinolizosomi* - rezultă din unirea unui lizozom primar cu o veziculă de secreție (crinofagie).

4. *corpui multiveziculari* - sunt lizosomi secundari - în care procesele digestive s-au terminat; în interiorul lor se află un număr variabil de microvezicule;



Fig.63. Ultrastructura unui corp multivezicular. 1-membrana lizozomului secundar; 2-matrice; 3-microvezicule; 4-mitocondrii; 5-granule de glicogen.

5. *corpui reziduali* sunt vacuole provenite dintr-un hetero- sau autolizozom în care persistă reziduuri nedigerate de enzimele lizozomale (figurile mielinice).

11.1.2. Structura moleculară.

Pe lângă elementele de structură, lizosomii conțin aproximativ 50 de tipuri de enzime hidrolazice acide (activate la p.H 3 - 6), în stare latentă, din care fosfataza acidă este enzima marker.

Ele sunt reprezentate de proteaze, peptidaze, nucleaze (D.N. -ază și

R.N. - ază), fosfataze, lipaze, esteraze, glucozidaze, etc.

11.2. PEROXISOMII

Peroxisomii sunt organite ultramicroscopice comune tuturor celulelor cu un bogat conținut de peroxidaze, catalizând reacția de formare (oxidază) și de descompunere (catalază) a peroxidului de hidrogen (H_2O_2), compus toxic pentru celulă.

11.2.1. Ultrastructura peroxisomilor

Au o formă sferică și după dimensiuni se clasifică în:

1. peroxisomi propriu-ziși cu un diametru de 0,5 - 1,5 nm;
2. microperoxisomi cu diametru de 0,2 - 0,4 nm;

Din punct de vedere morfologic, peroxisomii sunt formați din membrană și matrice iar la nivelul peroxisomilor propriu-ziși se mai adaugă nucleoidul și placa marginală.

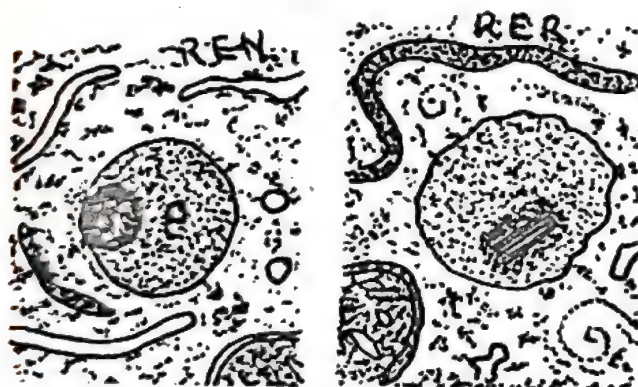


Fig.64. Schema electrono-microscopică a peroxisomilor. P. - peroxisomi; R.E.G. -reticul endoplasmatic rugos; R.E.N. - reticul endoplasmatic neted; M. mitocondrie.

1. *Membrana* are o grosime de 6-8 nm și un aspect trilamelat;
2. *Matricea* este fin granulată, omogenă, mai densă la fluxul de electroni decât cea a lizosomilor, putând conține uneori microfilamente ramificate cu diametrul de 4-5,5 nm.

3. *Nucleoidul* se găsește în peroxisomii celulelor de vertebrate în afară de pasăre și om; este o structură densă formată din microtubi cu diametrul de 4,5 nm, dispuși asemănător unui fagure de miere.

4. *Placa marginală* se găsește în peroxisomii celulelor tuturor speciilor de mamifere; sub formă de lame dense la fluxul de electroni de 8,5 nm grosime.

Aceste două ultime structuri se găsesc în majoritatea tipurilor celulare, mai bine reprezentate în peroxisomii propriu-ziși din fibroblaste,

endotelii, granulocite eozinofile și în celulele care sintetizează hormoni steroizi.

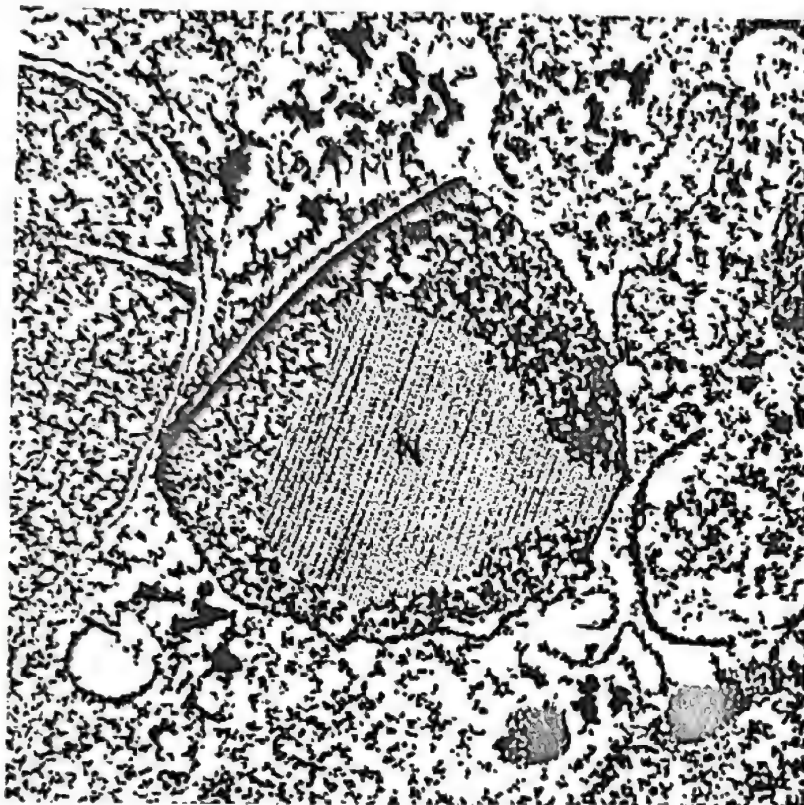


Fig.65. Ultrastructura peroxisomilor cu nucleoid și placă marginală.

11.2.2. Structura moleculară

Din echipamentul enzimatic al peroxisomilor, catalaza reprezintă enzima marker.

Prin conținutul lor enzimatic, peroxisomii îndeplinesc următoarele funcții: respiratorie, în reglarea catabolismului glucozei, în degradarea acidului uric, în producerea unei mici cantități de energie și în metabolismul lipidelor.

Atât lizosomii cât și peroxisomii sunt implicați în apariția unor manifestări patologice congenitale.

XII. ORGANITELE MOTILITĂȚII CELULARE.

Toate mișcările celulare se realizează prin intervenția elementelor citoscheletale. Există diferite categorii de mișcare.

1. Mișcări provocate de contracția musculară: actină - miozină
2. Mișcări care modifică raportul celulă - mediu extern:
 - a. mișcarea ameboidă actină - miozină
 - b. mișcarea prin flageli dineină - tubulină
 - c. mișcarea ciliară dineină - tubulină
3. Mișcări care nu modifică raportul celulă - mediu extern:
 - a. mișcările din endo și exocitoză actină - miozină
 - b. mișcările din cursul diviziunii celulare actină- miozină
dineină - tubulină

Cele două sisteme moleculare: actină miozină și dineină - tubulină care stau la baza mobilității celulare formează trei structuri: citoschelet.

1. microfilamente de actină;
2. microtubi;
3. centrioli.

12.1. MICROFILAMENTE

Microfilamentele sunt structuri fibrilare cu un diametru de aproximativ 7nm și lungimi variabile, alcătuite din proteine contractile (actină), vizibile numai în microscopia electronică.

În celulele nemusculare microfilamentele se găsesc fie în toată matricea, fie numai în ectoplasmă; ele pot fi izolate sau grupate (în microvillii, desmozomi în bandă, rădăcini ciliare).

Microfilamentele din ectoplasmă se ancorează la fața profundă a plasmalemei prin alfa-actinină.

În celula nervoasă există complexe filamentose numite **neurofibrile**. În microscopia fonică, neurofibrilele se pot pune în evidență prin tehnici speciale (Carey - cu aur, Gros - Schultze - azotat de argint); ele ocupă atât corpul celulei (pericarion) cât și prelungirile axonice și dendritice. La microscopul electronic, neurofibrilele sunt alcătuite din neurofilamente.

În celulele epiteliale ale epidermului, examinate la microscopul fonic prin colorarea cu hemalaun - roșu de Congo, se pot observa filamente de keratină cu dispoziție ordonată sau neorientate numite

tonofibrile (keratina se colorează în roșu închis).

La microscopul electronic, tonofibrilele sunt formate din tonofilamente izolate sau grupate.

12.2. MICROTUBII

Microtubii sunt structuri tubulare cu un diametru de 25 nm și un ax clar de aproximativ 15 nm și lungimi variabile. Peretele lor este format din 13 protofilamente paralele formate prin polimerizarea unor heterodimere de tubulină alfa și beta, dispuse helicoidal, cu înclinație de 10 - 25 grade.

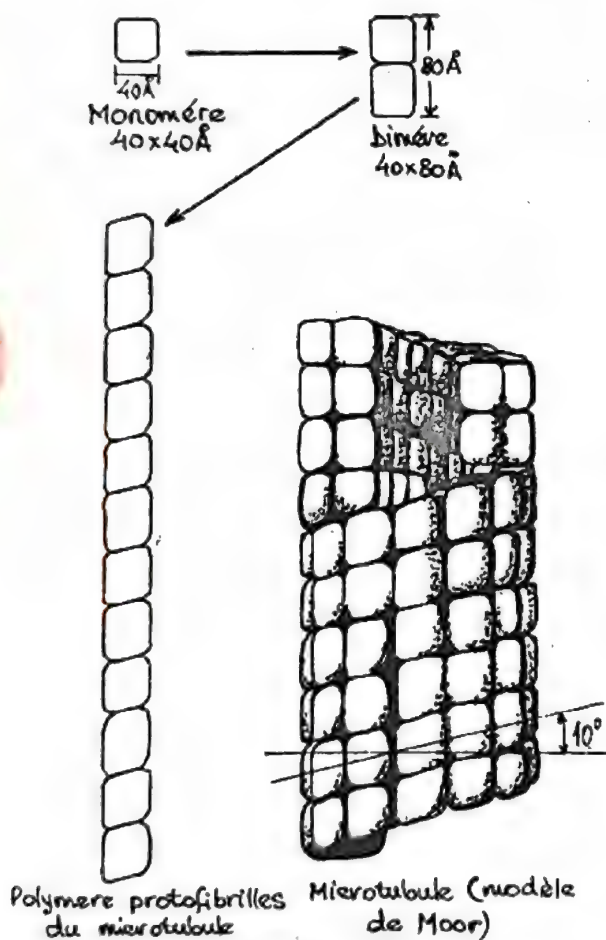


Fig. 66. Reprezentarea tridimensională a unui microtub arătând dispoziția subunităților care îl formează.

Stabilitatea microtubilor variază în funcție de structurile pe care le edifică; astfel, microtubii liberi din citosol, din aster și fusul de diviziune sunt **formațiuni labile** (asamblare și dezasamblare) pe când complexe de microtubi din axoneme, centrioli și corpusculi bazali sunt **elemente stabile**.

Utilizarea unor tehnici de imunocitochimie care folosesc antitubulina, permit vizualizarea microtubilor în microscopia fonică.

Microtubii îndeplinesc următoarele roluri: mențin forma celulară, ghidarea mișcării diferitelor componente celulare, construiesc fusul mitotic, se asociază formând centriolii, axul ciliar și flagelii.

12.3. CENTRUL CELULAR

Centrosomul sau centrul celular este un organit nemembranar prezent în toate celulele care se divid.

12.3.1. În microscopia fonică prezintă aspecte diferite în raport de faza ciclului celular.

În interfază are forma unei structuri granulare numită **centrosom** în interiorul căruia se află 1 - 2 corpusculi sau **centrioli** (asocierea a doi centrioli = diplosom), înconjurată de o masă citoplasmatică densă numită **centrosferă**.

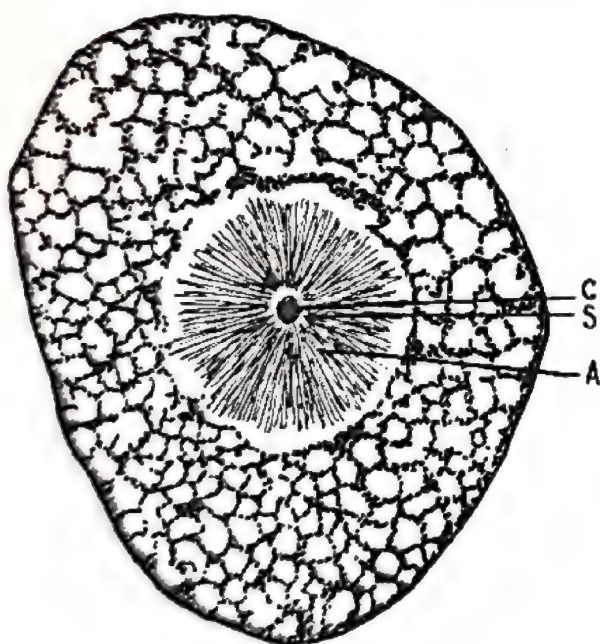


Fig.67. Centrul celular într-un ovocit. C. = centrosom; S. = centrosferă; A. = aster.

Din centrosferă se detașează elemente fibrilare cu dispoziție radiară formând **asterul**.

Ansamblul centrosferă - aster se numește **astrosferă**. Punerea în evidență a centrului celular se realizează cu tehnica lui Fleming (tripla colorare cu safranină - violet de gențiană - orange G).

12.3.2. În *microscopia electronică* elementul distinct este **centriolul** care apare sub forma unui cilindru cu lungimea de 0,35 micrometri și un

diametru de 0,15 micrometri; peretele este format din 9 grupuri a câte 3 microtubi sau triplete.

Fiecare microtub este alcătuit din 13 protofilamente cu un diametru de 25 nm dispuse împrejurul unei cavități centrale.

Microtubii fiecărui triplet sunt notați cu A, B și C, tubul intern=A, cel extern=C. Microtubii A și C de la două triplete vecine sunt uniți printr-o bandă densă la fluxul de electroni.



Fig.68. Aspectul electronmicroscopic al unui diplosom cu dispoziția caracteristică a celor doi centrioli.

Fiecare centriol are o extremitate **proximală** orientată spre centrul celulei și o extremitate **distală** orientată spre periferia ei; centrul extremității distale este ocupat de un cilindru electronodens unit de fața internă a microtubilor A prin 9 linii dense.

Într-un diplosom, cei doi centrioli sunt așezați perpendicular unul pe celălalt.

Structurile asociate centriolilor sunt reprezentate de: sateliții pericentriolari (formațiuni sferice) și microtubi.

Înainte de începutul mitozei centriolii se duplică și fiecare din cele două perechi migrează în cursul diviziunii la polii opuși ai celulei (ciclul centriolar).

12.4. INCLUZIUNILE CELULARE

În hialoplasmă se pot găsi incluziuni celulare care reprezintă produse ale activității celulare, sub forma substanțelor de rezervă sau deșeurilor de metabolism.

Spre deosebire de organele celulare care au un caracter permanent, incluziunile sunt temporare.

Incluziunile pot fi formate din:

12.4.1. *Substanțe proteice.* Dintre acestea amintim hemoglobina care este o proteină cu activitate respiratorie (hemocianina, o altă proteină cu rol respirator, se evidențiază în citoplasma celulelor sanghine de la numeroase moluște și artropode sub forma unor cristale voluminoase).



Fig.69. Evidențierea glicogenului (PAS) în hepatocite.

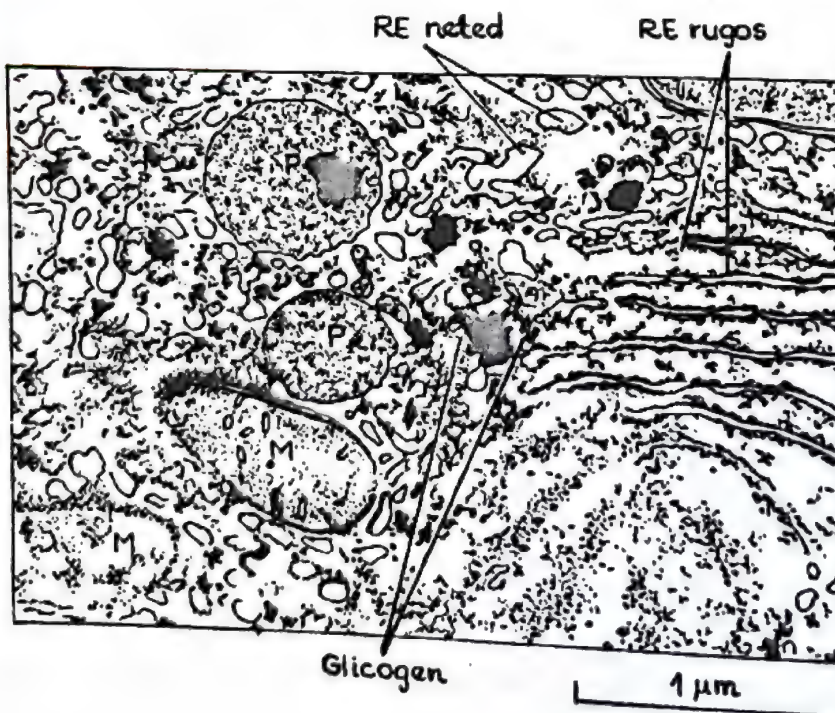


Fig.70. Glicogenul în microscopia electronică.

12.4.2. **Lipidele** apar la microscopul fonic sub forma unor picături sferice evidențiate cu coloranți specifici de tipul Sudanului sau OsO₄ în hepatocite, celulele corticosuprarenale și corpului galben din ovar. La microscopul electronic, acumulările de grăsimi au forme ovalare sau sferice, de diferite mărimi.

12.4.3. **Glicogenul** evidențiat cu carmin Best sau P.A.S. apare în microscopia fonică sub forma unor granule sau plaje de diferite mărimi, în special în hepatocite și celulele musculare.

În microscopia electronică apar sub forma unor rozete de glicogen cu diametrul de 15 - 30 nm, asociate frecvent reticulului endoplasmatic neted.

12.4.4. **Substanțe minerale** reprezentate de fier, siliciu - evidențiate prin tehnici de citochimie.

Incluziunile pot fi formate din:

12.4.1. **Substanțe proteice.** Dintre acestea amintim hemoglobina care este o proteină cu activitate respiratorie (hemocianina, o altă proteină cu rol respirator, se evidențiază în citoplasma celulelor sanghine de la numeroase moluște și artropode sub forma unor cristale voluminoase).



Fig.69. Evidențierea glicogenului (PAS) în hepatocite.

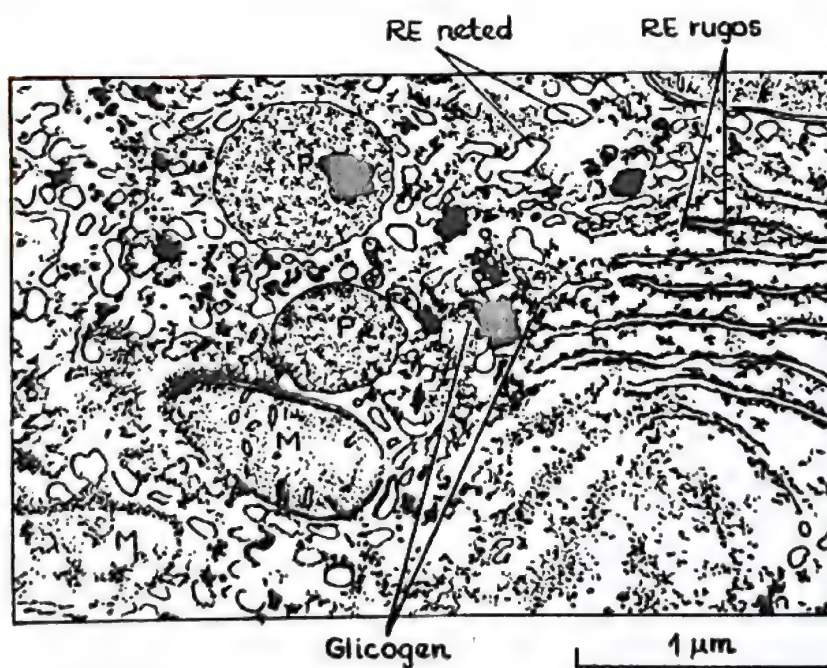


Fig.70. Glicogenul în microscopia electronică.

12.4.2. **Lipidele** apar la microscopul fonic sub forma unor picături sferice evidențiate cu coloranți specifici de tipul Sudanului sau OsO₄ în hepatocite, celulele corticosuprarenale și corpului galben din ovar. La microscopul electronic, acumulările de grăsimi au forme ovalare sau sferice, de diferite mărimi.

12.4.3. **Glicogenul** evidențiat cu carmin Best sau P.A.S. apare în microscopia fonică sub forma unor granule sau plaje de diferite mărimi, în special în hepatocite și celulele musculare.

În microscopia electronică apar sub forma unor rozete de glicogen cu diametrul de 15 - 30 nm, asociate frecvent reticulului endoplasmatic neted.

12.4.4. **Substanțe minerale** reprezentate de fier, siliciu - evidențiate prin tehnici de citochimie.

XIII. DIVIZIUNEA CELULARĂ

Toate celulele organismului uman în afara celor nervoase sunt capabile să se multiplice adică să formeze două celule fiice cu aceleași caractere morfologice și funcționale ca și celula mamă (în anumite cazuri, una sau cele două fiice nu seamănă cu celula mamă).

Prin diviziune celulară se realizează un proces de diferențiere și creștere, de menținere a structurii și funcțiilor organismelor precum și reproducerea lor.

La om, multiplicarea celulară se face prin:

- a. diviziune indirectă, cariochineză sau mitoză;
- b. diviziune directă sau amitoză (în unele situații).

13.1. METODE DE STUDIU

Evenimentele care caracterizează multiplicarea sunt studiate prin tehnici variate care pun în evidență structuri sau edificii moleculare apărute în această etapă a ciclului celular.

13.1.1. *Observarea în microscopia fotonică*

Celulele pot fi observate fie în vivo (culturi de celule) fie pe secțiuni, după fixare, cu ajutorul microscopului fonic obișnuit, cu contrast de fază, cu fluorescență, etc.

Observarea in vivo permite înregistrarea mișcărilor celulare prin microcinematografie ceea ce aduce o contribuție importantă la studiul diviziunii pe plan dinamic.

13.1.2. Observarea în *microscopia electronică* (TEM) permite identificarea structurilor nucleare și citoplasmice care participă la mitoză: microtubii fusului de diviziune, microfilamente, ciclului centriolar, cromozomii, etc.

13.1.3. *Utilizarea antimitoticilor* de tipul colchicinei, vinblastinei și vincristinei care inhibă polimerizarea dimerelor de tubulină, permit studiul optic al fusului de diviziune și a cromosomilor.

13.1.4. *Izolarea aparatului mitotic* se realizează prin stabilizarea aparatului mitotic cu agenți chimici (glicoli cu lanț lung sau solvenți organici) și înlăturarea altor constituenți celulari printr-un detergent.

Izolarea aparatului mitotic se realizează prin introducerea celulelor (ouăle de arici de mare, moluște) într-un mediu cu p.H. ușor acid conținând Triton x 100 (detergent) și tubuline extrase din creier, Mg^{2+} , A.T.P. sau G.T.P. și se studiază în microscopia cu lumină polarizată.

13.2. MITOZA

Diviziunea indirectă sau mitoza produce modificări morfologice și biochimice atât la nivel nuclear cât și citoplasmatic. Ea prezintă două forme:

- a. mitoza somatică sau propriu-zisă (ecuațională);
- b. mitoza reducțională sau meioza.

13.2.1. Mitoza somatică

Prin mitoză somatică sau ecuațională (homeotipică) zestrea genetică maternă se împarte în mod egal între cele două celule fiice (set cromozomal diploid) și se desfășoară în patru etape succesive: profaza, metafaza, anafaza și telofaza.

13.2.1.1. Profaza se caracterizează prin:

a. *în nucleu* apar cromozomii prin spiralizarea fibrelor cromatiniene care migrează către periferia lui; centromerul sau chinetocorul a cărui poziție este constantă pentru fiecare cromozom, devine vizibil.

b. *în citoplasmă* cei doi centrioli împreună cu procentriolii lor se îndepărtează unul de celălalt, între ei apărând microtubii cu dispoziție radiară (microtubii asterieni).

Înainte de a doua etapă, învelișul nuclear și nucleolul dispar progresiv iar cromozomii migreză către planul ecuatorial al celulei; chinetocorii sunt mai evidenți și devin funcționali determinând organizarea microtubilor fusului de diviziune (microtubi chinetocorienii).

13.2.1.2 În **metafază** cromozomii se scurtează prin accentuarea spiralizării și ocupă un plan care corespunde ecuatorului celulei formând **placa ecuatorială**; cromatidele sunt orientate către periferia celulară iar centromerele formează placa ecuatorială.

La sfârșitul metafazei, la nivelul fiecărui cromozom apare un clivaj longitudinal care interesează atât cromatidele cât și centromerele.

Procentriolii cresc și cei doi diplosomi sunt uniți de cromosomi prin microtubii fusului de diviziune.

Suprafața celulară prezintă mișcări de fierbere.

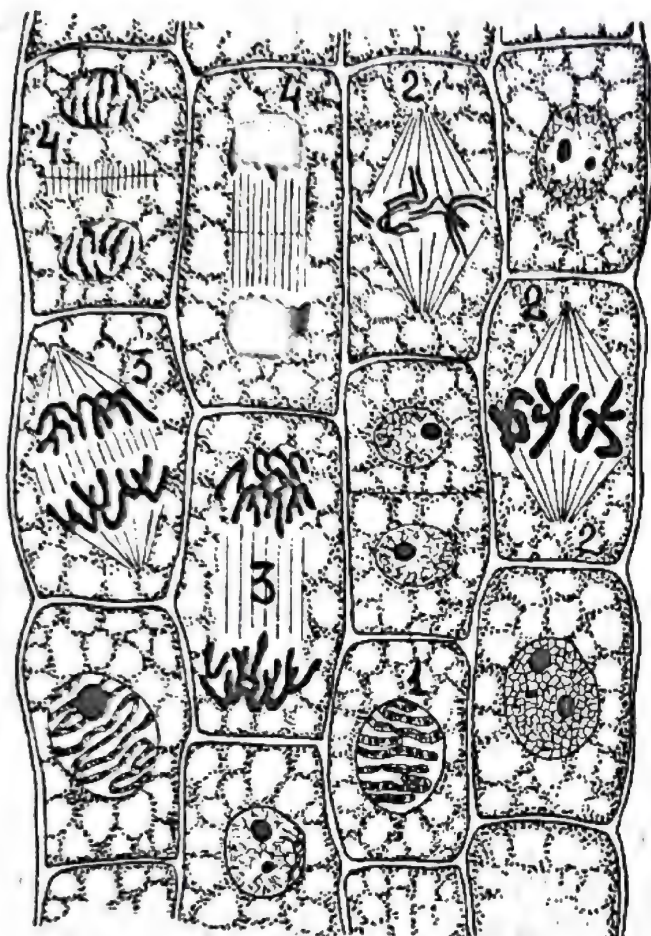


Fig.71. Diferite stadii ale diviziunii cariochinetice în celulele din vârful germinativ al rădăcinii de ceapă: 1- profază; 2-metafază; 3-anafază; 4- telefază.

13.2.1.3. În anafază se produce clivarea totală a celor 46 de cromozomi în două grupe identice (92 cromozomi); fiecare din ele migrând către polii opuși ai celulei.

Spre sfârșitul anafazei cele două loturi de cromozomi ocupă cei doi poli ai celulei iar zona de citoplasmă care-i separă este ocupată de microtubi interzonali.

13.2.1.4. În telofază cromozomii se despiralizează; apare învelișul nuclear și din organizatorii nucleolari se formează nucleolii.

Șanțul de diviziune apărut la sfârșitul anafazei se adâncește progresiv în plan ecuatorial, perpendicular pe fasciculele de microtubi interzonali.

Organitele se repartizează aproximativ egal în vecinătatea fiecărui nucleu, mișcările periferice diminuează progresiv iar cele două celule fiice se separă complet (citodierează).

13.2.2. Mitoza reduțională

Mitoza reduțională sau meioza este diviziunea care are loc în cursul gametogenazei și care asigură reducerea la jumătate a numărului de cromozomi (set haploid de cromozomi = 23). Ea se derulează în gonade (testicul și ovar) și constituie unul din fenomenele cele mai importante ale evoluției liniei germinale.

Spermatocitele și ovocitele de ordinul I, celule încă diploide se multiplică prin meioză formând spermatocitele și ovocitele de ordinul II, celule haploide.

Diviziunea reduțională se derulează tot în patru faze ca și mitoza somatică: profaza, metafaza, anafaza și telofaza. Caracteristică este profaza primei mitoze a meiozei care are cinci etape: leptoten, zigoten, pachiten, diploten și diachineză.

13.2.2.1. Profaza este etapa cea mai lungă în care se realizează reducerea numărului de cromozomi.

a. *Stadiul leptoten* începe odată cu creșterea în volum a nucleului, replicarea A.D.N. - ului cromozomial și diferențierea cromozomilor care se găsesc în număr diploid.

b. *Stadiul zigoten* se caracterizează prin acolarea longitudinală a cromozomilor omologi (fiecare autozom de origine maternă se acolează la autozomul omolog de origine paternă). O astfel de pereche ia numele de cromozom bivalent sau diadă.

La sfârșitul acestei faze se găsesc 22 cromozomi bivalenți, deci s-a efectuat reducerea la jumătate a garniturii cromozomiale.

Cromozomii sexuali (xy și xx) alcătuiesc o formațiune cunoscută sub numele de veziculă sexuală.

c. *Stadiul pachiten* - La nivelul fiecărei cromatide din diadă apare un clivaj longitudinal care determină apariția a două cromatide paralele. În urma acestui clivaj, fiecare bivalent va avea patru cromatide alcătuind o tetradă.

În această fază are loc un schimb de material genetic între cromatidele de origine paternă și cele de origine maternă, schimburi realizate prin legături chiazmatice (crossing over).

d. *Stadiul diploten* se caracterizează prin separarea cromozomilor omologi din fiecare bivalent, ei rămânând legați numai la nivelul chiazmelor.

e. *Stadiul de diakineză*. Cromozomii bivalenți migrează spre periferia nucleului, legăturile lor chiazmatice reducându-se foarte mult. Se individualizează cromozomii sexuali (xy sau xx). Dispare nucleolul iar

membrana nucleară se dezintegrază.

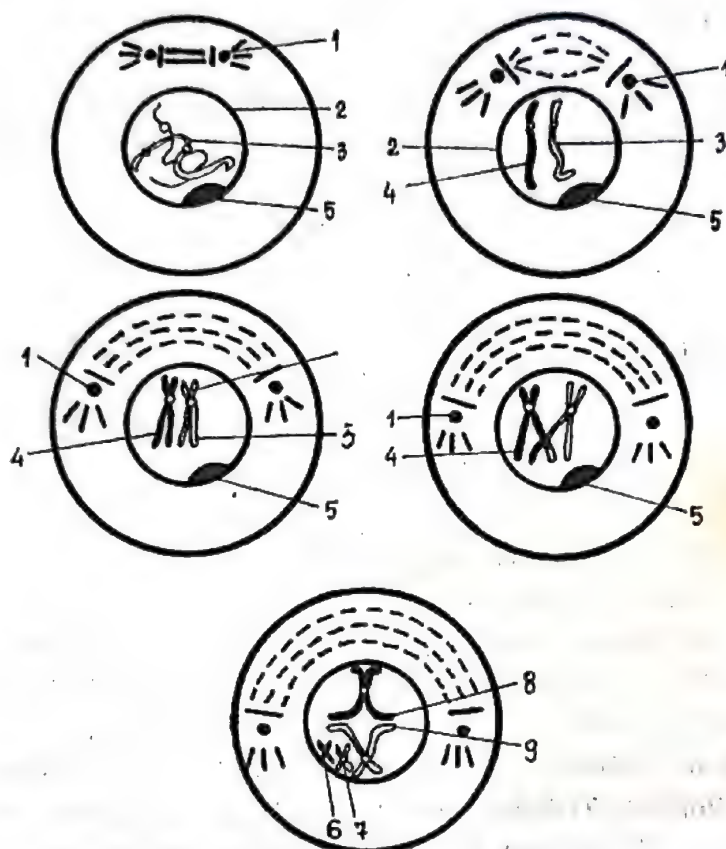


Fig.72. Reprezentarea schematică a profazei meiozei. 1-centrioli; 2-nucleu; 3-autozom matern; 4-autozom patern; 5-vezicula sexuală; 6-gonozom X; 8-material genetic matern; 9-material genetic patern.

13.2.2.2. Metafaza

Cromozomii ocupă planul ecuatorial al celulei iar pe fiecare centromer se inseră microtubii fusului de diviziune.

13.2.2.3. Anafaza

Cromozomii din fiecare bivalent se separă, fenomen denumit disjuncție și migrează spre polii celulei.

13.2

Ma
și ovocitel
haploidă, 1

13.

A
somatice,
cromozon

13

Î
citodiere
plasmod

13.2.2.4. Telofaza

Marchează începutul formării celor două celule fiice a spermatocitelor și ovocitelor II, cu echipamentul cromozomial redus la jumătate (formula haploidă, $N = 23$ cromozomi).

13.2.3. Diviziunea de maturare

A doua diviziune a meiozei se desfășoară conform unei mitoze somatice, realizând o diviziune ecuațională dar pe celule deja haploide (23 cromozomi), în urma căreia se formează spermatidele și ovotidele.

13.3. AMITOZA SAU DIVIZIUNEA DIRECTĂ

Prin diviziunea directă se formează două celule fiice prin simpla strangulare a nucleului și a citoplasmei celei mame, fără apariția cromozomilor, după autoreplicarea materialului genetic.

Se întâlnește în hepatocite, celule cartilaginoase și osoase, etc.

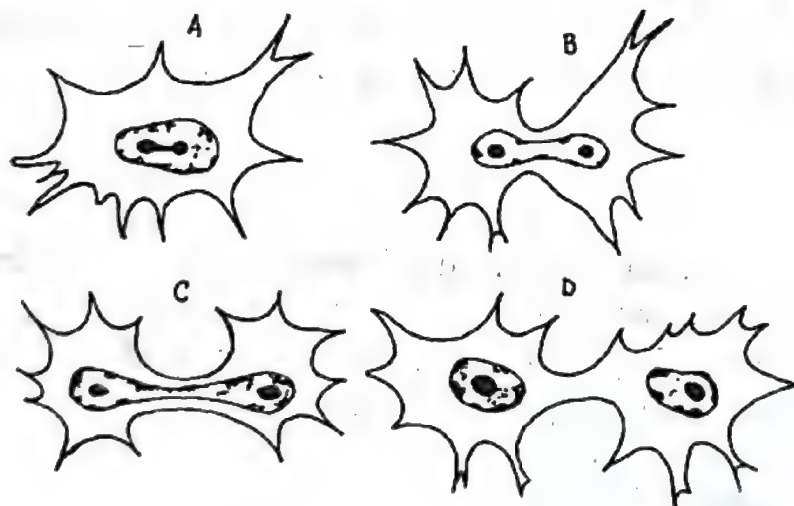


Fig.73. Amitoza.

În unele cazuri (hepatocite) diviziunea nucleului nu este însoțită și de citodiereză ducând la apariția celulelor bivalente (în același mod iau naștere plasmodiile).

XIV. DIFERENȚIEREA CELULARĂ

Diferențierea este proprietatea unor celule ce implică creșterea complexității gradului de organizare structurală, ca un corolar al specializării sale funcționale și se realizează prin diviziuni de diferențiere (heterotipică).

Procesul de diferențiere se desfășoară pe tot parcursul vieții individului, începând încă din perioada preembrionară în care se formează gameții și terminând cu moartea.

Aprecierea gradului de diferențiere celulară se estimează prin criterii morfologice, funcționale și biochimice.

a. *Criteriile morfologice* oferă relații cu privire la forma și volumul celulelor, la structuralitatea lor internă.

Materialul ideal pentru studiul diferențierii este și va rămâne totdeauna embrionul.

b. *Criteriile funcționale* sunt reprezentate de activități funcționale specifice: motilitatea (spermatozoidul), contractilitatea (fibra musculară), secreția (celule glandulare), etc.

c. *Criteriile biochimice* evidențiază: instalarea unei activități metabolice specifice prin activarea unor enzime specifice, acumularea unei substanțe specifice ca hemoglobina, mioglobina, etc.

14.1. GAMEȚII

Ovulul și spermia (gameții) constituie exemple de celule înalt diferențiate. Ele derivă din două celule stem: spermatogonia Ad. și ovogonia, foarte asemănătoare ca dimensiuni, forme și structură. Celulele adulte apte pentru fecundare, spermia și ovulul, sunt total deosebite.

14.1.1. Spermatozoizii

Spermiile sau spermatozoizii sunt celule flagelate cu o lungime de aproximativ 60 microni.

a. *La microscopul fonic* apare sub forma unei celule filiforme alcătuită din trei porțiuni:

1. *capul*, alungit și aplatizat, măsurând 5 microni lungime și 2 - 3 microni lățime; conține nucleul cu cromatina omogenă și condensată iar cele 2/3 libere (anterioare) constituie acrosomul.

2. *coada*, porțiunea cea mai efilată a celulei, conferă mobilitatea

spermatozoidului.

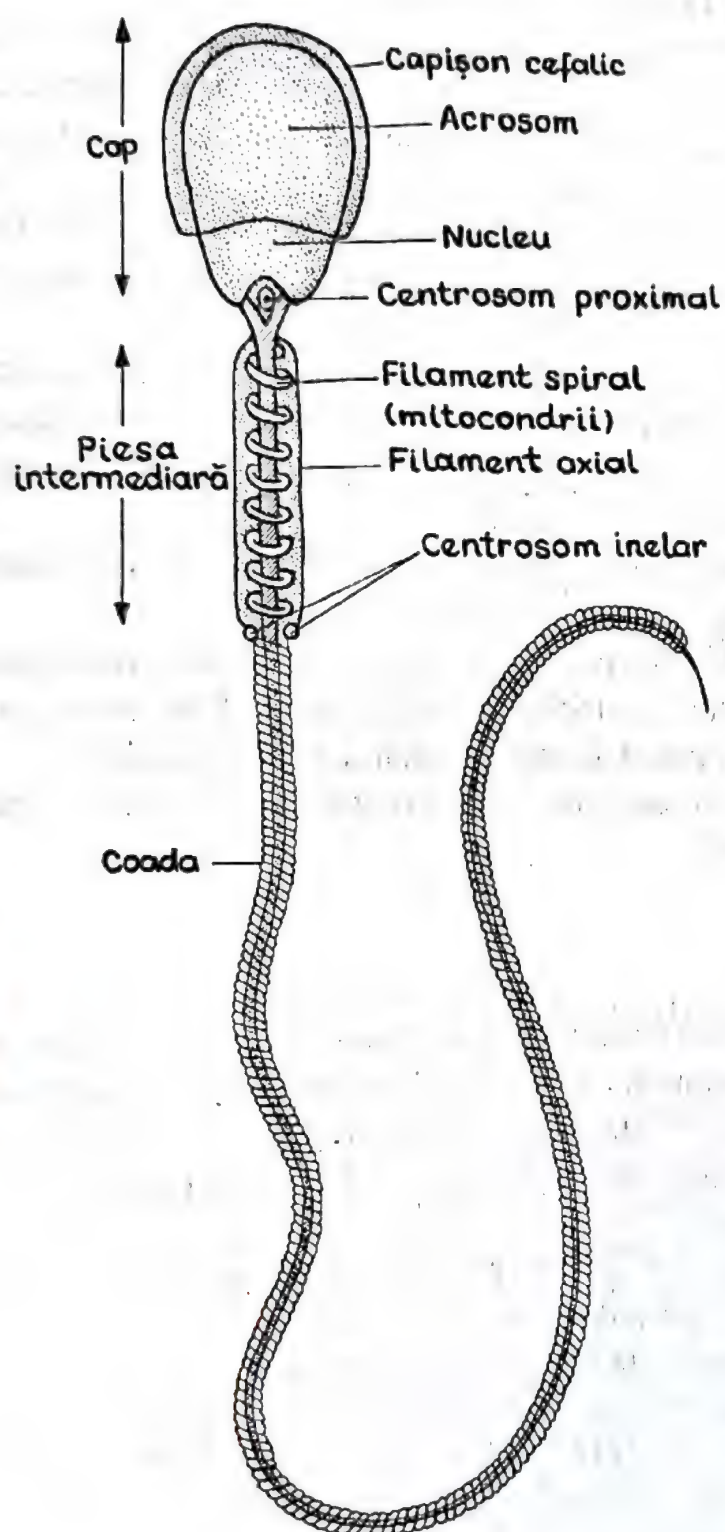


Fig.74. Structura spermatozoidului uman.

b. La microscopul electronic structura spermatozoidului este complexă, el fiind format din:

1. Capul spermatozoidului este ocupat în cea mai mare parte de

nucleu; polul anterior al nucleului este învelit de acrosom iar cel posterior prezintă o depresiune numită **fosetă de implantare**.

2. Gâtul deși are dimensiuni foarte reduse (0,4 microni lungime), este o regiune complexă ca structură. În foseta de implantare se găsește un material dens la fluxul de electroni numit **placă bazală** la care aderă o piesă de joncțiune constituind **coloanele segmentare** de forma unui clopot sub care se găsește **centriolul proximal**. De coloanele segmentare se prind 9 fibre dense care înconjură un complex **filamentos axial** format din 9 dublete de microtubi periferici și un dublet central.

3. Piesa intermediară cu o lungime de 4 - 5 microni are centrul ocupat de fibrele dense și complexul filamentos axial. În afara lor se găsesc numeroase mitocondrii cu dispoziție helicoidală - **spirala mitocondrială** - conținute într-o pătură subțire de citoplasmă.

Extremitatea distală a piesei intermediare este limitată de o îngroșare a plasmalemei numită **anulus**.

4. Piesa principală are centrul ocupat de complexul filamentos axial înconjurat de fibrele dense; în afara lor se găsesc elemente fibrilare dispuse în spirală formând **pătura fibroasă** situată imediat sub plasmalemă.

5. Piesa terminală nu conține decât complexul filamentos axial acoperit de membrana celulară.

14.1.2. Ovulul

Ajuns la completa sa dezvoltare, ovulul este o celulă sferică ce un diametru de 200 microni, înconjurat de o pătură de mucopolizaharide care formează **membrana pellucidă**, dublată de o pătură de celule foliculare numită **coroana radiată**. Între **plasmalema ovulului** și membrana pellucidă se găsește primul globul polar.

Nucleul are un diametru de 25 microni și un aspect veziculos (vezicula germinativă); nucleolul apare intens cromatic.

Citoplasma bine reprezentată conține mitocondrii mici cu numeroase creste, un număr însemnat de ribozomi liberi și un R.E.G. redus; complexul Golgi este dispus perinuclear și periferic iar R.E.N. este reprezentat de vezicule de diferite mărimi. Incluziunile citoplasmice de vitelius - se găsesc dispersate în toată masa citoplasmatică.

În ovocit activitatea celulară este întreruptă (blocat în metafaza celei de a 2 - a diviziuni de maturare), ea reluându-se după pătrunderea unui spermatozoid.

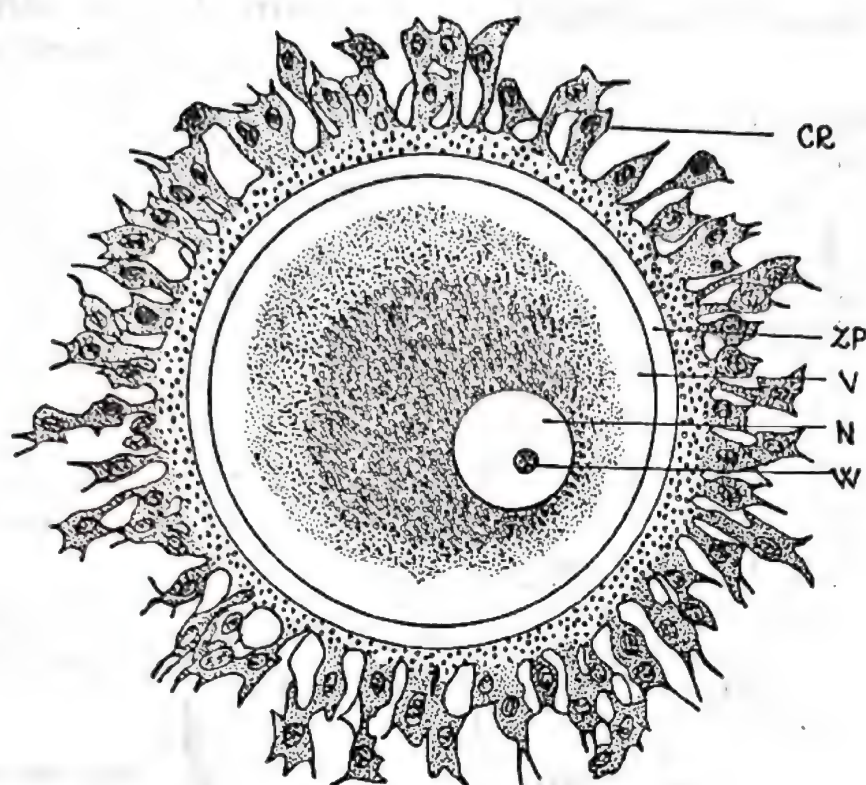


Fig.75. Aspectul ovulului în microscopia fotonică.

CR - coroana radiată
ZP - zona pelucidă

V - stratul periferic
al citoplasmei

N - nucleu
W - nucleol

14.2. DIFERENȚIEREA ÎN EMBRIOGENEZĂ

Fecundarea sau fertilizarea este un fenomen biologic complex care asigură reproducerea speciei; ea se realizează prin unirea spermatozoidului cu ovulul urmată de contopirea intimă a maselor citoplasmatiche și nucleare numită **amfimixie**. Din această contopire rezultă o celulă unică numită **ou fecundat** sau **zigot** cu un set diploid de cromozomi (23 materni și 23 paterni).

Zigotul este o celulă **pluripotentă** deoarece din ea vor lua naștere toate tipurile celulare care edifică un organism adult.

După formarea zigotului începe o nouă etapă a diferențierii numită **segmentare** (o succesiune de mitoze somatice) în urma căreia apare prima structură embrionară numită **morulă**; în acest stadiu încep să apară diferențe de talie și poziție; micromerele ocupă polul animal iar macromerele polul vegetativ, deși toate celulele morulei au un echipament genetic identic.

În a doua săptămână de dezvoltare diferențele sunt și mai evidente:

se formează **blastula**, apare butonul embrionar din a cărei celule iau naștere

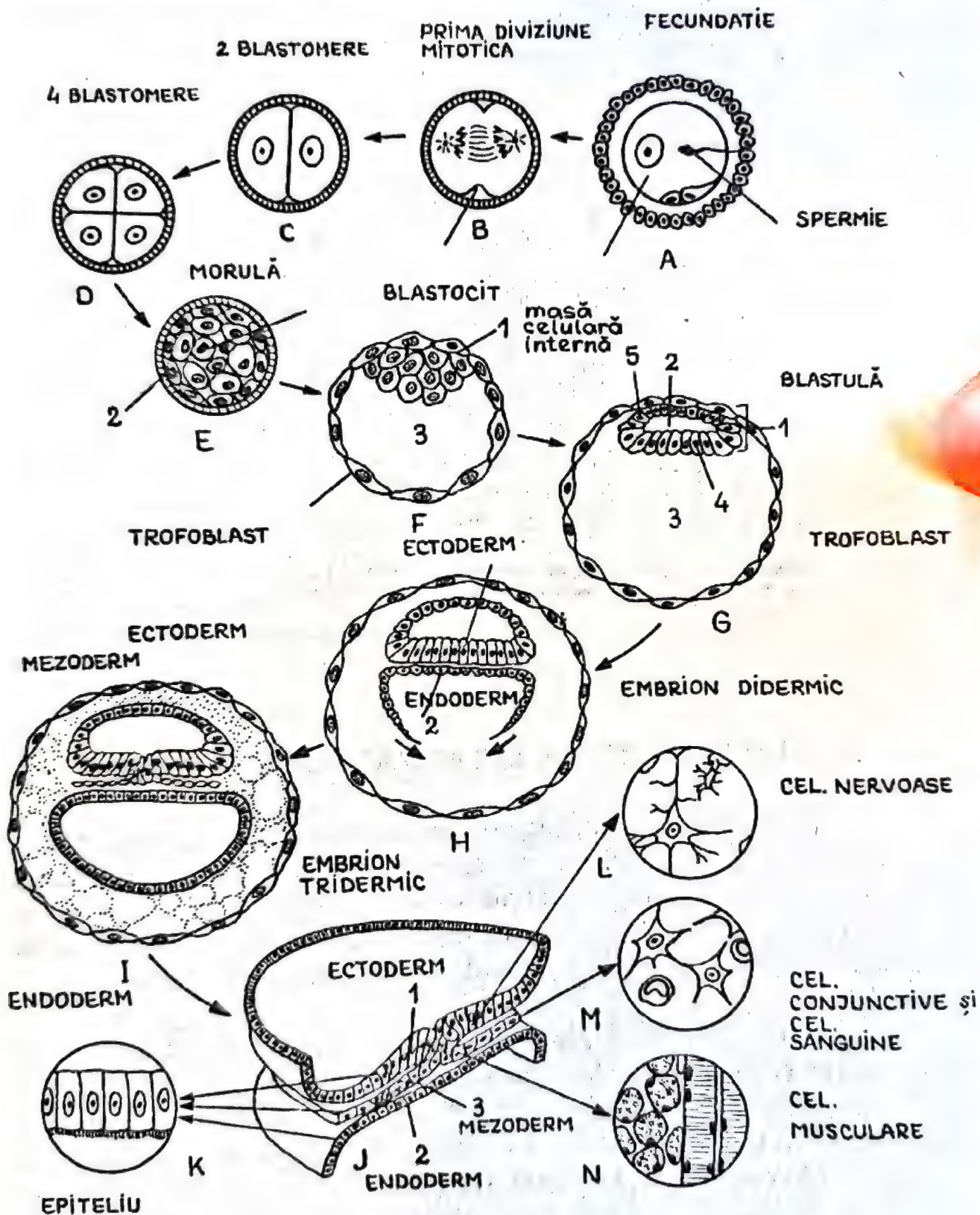


Fig.76. Diferențierea celulară în embriogeneză.

primele două foițe embrionare: **endoblastul** alcătuit din celule mici și **ectoblastul** alcătuit din celule mari.

Celulele acestor două foițe sunt obligate să urmeze un anumit traseu evolutiv - **celule determinate** - prin represarea unor gene și activarea altora, sub acțiunea unor **factori inductori**. Pentru ca inductorii să poată acționa, celulele țintă ale celor două foițe embrionare (mezoblastul, a 3 - a foiță embrionară, se diferențiază dintr-un anumit teritoriu al ectoblastului) trebuie să fie **permissive** adică să fie permeabile la inductor (receptori membranari specifici).

În dezvoltarea organismelor superioare numărul determinărilor succesive este egal cu numărul inductorilor. Aceste elemente crează în final **celulele stem** sau de origine ale diferitelor tipuri de celule specializate.

Diferențierea se caracterizează prin apariția unor modificări pe plan biochimic (sinteza unor proteine specifice: mioglobină, hemoglobină), funcțional (motilitate, contractilitate) și morfologic (cili, flageli, microvili).

XV. TEHNICI SPECIALE UTILIZATE ÎN BIOLOGIA CELULARĂ ȘI MOLECULARĂ

În capitolele anterioare au fost prezentate metodele de obținere a unor preparate biologice în care țesuturile îndeplineau condițiile impuse în vederea unor analize biochimice sau morfostructurale la nivel celular și subcelular.

Analizele morfostructurale au vizat mai ales tehnicile de microscopie fonică și electronică. Este adevărat însă că metodele de investigație în biologia celulară și moleculară nu se reduc doar la ele. Pe de altă parte, obținerea unor celule care să satisfacă cerințele impuse de mijloacele de investigare poate urma și alte căi, cum ar fi: utilizarea unor culturi de celule sau crio fracturarea.

De aceea, în acest ultim capitol autorii încearcă o prezentare succintă și a altor metode folosite curent în biologia celulară și moleculară, fără a avea însă pretenția că le-ar fi epuizat.

15.1. CULTURI DE CELULE

Majoritatea tipurilor de celule animale și vegetale pot supraviețui în condiții corespunzătoare într-un vas de culturi de celule. Prin cultura de celule se obține o multiplicare "in vitro" a celulelor provenite dintr-un fragment de țesut.

Se poate studia comportamentul celulelor în condiții strict definite; este posibil să determinăm efectele asupra comportamentului celular prin adăugarea sau extragerea de molecule specifice (hormoni sau factori de creștere) și să obținem populații omogene de celule pentru analize biochimice sau pentru studiul interacțiunilor între un tip celular sau altul.

Observațiile efectuate se verifică în comparație cu comportamentul celulelor "in vivo" (mediul natural). Metoda permite:

1. Studiul caracterelor morfologice și proprietăților biologice ale celulelor din diferite țesuturi, separate de organism și sustrate influenței sistemului nervos și curentului sanguin;
2. Studiul unor probleme de biologie tisulară (de exemplu afinitatea sau antagonismul între sușe tisulare diferite);

Cultura de celule a început în 1907 cu un experiment destinat rezolvării unei controverse în neurologie, "doctrina neuronală", care susținea că fiecare fibră nervoasă provine dintr-o singură celulă nervoasă și nu este produsul fuziunii mai multor celule; doctrina a fost confirmată și au fost

puse bazele culturilor de celule. Experimentele din 1907 au implicat cultura unor fragmente mici de țesuturi sau explante. Astăzi culturile se fac mai ales din suspensii de celule disociate din țesuturi existând posibilitatea purificării tipurilor celulare individuale din amestecul de tipuri de celule diferite.

15.1.1. *Tipuri de culturi de celule.*

I. După felul substratului, culturile de celule pot fi:

- pe suport organic nutritiv;
- pe suport organic nenutritiv;
- pe suport anorganic;
- în suspensie în mediul lichid.

II. După modul de inițiere a culturii:

A. Culturi inițiate cu fragmente de țesut:

a. pe suport nutritiv

- culturi în picătură suspendată
- culturi în flacoane
- culturi în tuburi rotative

b. pe suport nenutritiv

c. în suspensie în mediu lichid (se obține numai supraviețuirea celulelor)

B. Culturi inițiate cu celule dispersate:

a. culturi de celule libere în mod natural (culturi de leucocite din sângele periferic, de elemente hematopoietice din măduva osoasă sau de celule recoltate din exudate)

b. culturi de celule obținute prin dispersarea celulelor din fragmente de țesut

III. După tipul de material biologic cultivat:

A. Culturi de organe (organocultură) - reprezintă scoaterea din organism a unui fragment de organ (intestin, trahee, rinichi) și introducerea acestuia într-un mediu nutritiv; acestea se mențin "in vitro" un timp limitat.

B. Culturi de celule - se obține o multiplicare celulară "in vitro".

a. cultura de țesuturi obținută din fragmente de țesut; în jurul explantului (fragmentului extras) se formează o coroană de celule în multiplicare, de tip fibroblastic sau epitelial;

b. cultura celulară propriu-zisă obținută prin cultivarea într-un mediu nutritiv a unei suspensii de celule provenită prin dispersarea prin metode fizice sau metode chimice (asocierea factorilor chimici - enzime, agenți, chelatori - cu factori mecanici - agitație).

15.1.2. Materiale de lucru

Culturile de celule se prepară într-un spațiu de lucru steril, amenajat special, ce include instalația de apă curentă, gaze, electricitate. Nevoile de bază într-un laborator de culturi de celule sunt:

1. Arie de lucru sterilă.
2. Sticlărie, instrumente fine.
3. Dispozitive de curățat și sterilizat.
4. Recipiente de stocare pentru mediu, ser, sticlărie și altele.
5. Incubator și hotă cu flux laminar.
6. Sursă de apă.
7. Microscop, agitator magnetic, balanță analitică.
8. Substanțe chimice.

Spațiul de lucru steril necesită o iluminare adecvată, un trafic scăzut de aer, suprafețe de lucru ușor de curățat, o hotă laminară și lămpi de ultraviolete. Sticlăria trebuie să fie neutră, perfect transparentă, fără neregularități; se împarte în recipiente speciale în care se fac culturile și în sticlărie obișnuită de laborator.

Instrumente fine: bisturie, lame sterile, pense fine, foarfeci chirurgicale. Dispozitivele de curățat și sterilizat includ autoclave, un cuptor de sterilizare și spălătorie de pipete. Recipientele pentru stocare includ un frigider pentru stocarea mediului și serului, rafturi și dulapuri pentru sticlărie.

Incubatoarele necesare sunt cu manșon de apă sau cu CO_2 , în funcție de sistemul tampon folosit în mediu. Hota pentru flux laminar trebuie să fie suficient de mare pentru a putea pregăti mijloacele necesare preparării și hrănirii culturilor, cu o bună iluminare și un sistem de lumină UV pentru sterilizarea aerului.

Sursa de apă pentru clătire va fi pură, pentru aceasta fiind necesare un deionizor, un aparat din sticlă pentru distilat și un al doilea pentru bidistilarea apei. Totodată mai este necesar un microscop cu contrast de fază, un agitator magnetic pentru amestecarea soluțiilor și o balanță analitică.

Reușita culturii celulelor "in vitro" depinde în mare măsură de pregătirea sticlăriei, spălarea și sterilizarea ei, de pregătirea instrumentarului și în special de tehnicile aseptice aplicate. Mediul de cultură trebuie să asigure celulelor cultivate "in vitro" condiții apropiate de acelea pe care le oferă organismul viu.

Deosebiri esențiale dintre aceste două modalități de viață și de multiplicare celulară sunt:

- "in vivo", celulele sunt supuse controlului neuroendocrin și influenței țesuturilor și organelor din vecinătate; "in vitro" celulele nu mai suferă acest control;

- "in vivo", aportul de substanțe nutritive și eliminarea produselor de metabolism se face în mod continuu prin intermediul circulației sanguine și limfatice; "in vitro", aportul și eliminarea sunt periodice.

15.1.3. Tehnicile aseptice

Tehnicile aseptice presupun următoarele reguli:

- accesul limitat în zona de culturi celulare;
- suprafețele se decontaminează cu etanol 70% înainte și după utilizare;
- nu se pipetează cu gura, nu se mănâncă, fumează în zona de lucru;
- hainele de protecție se folosesc numai în cadrul incintei, fiind interzisă purtarea lor și în afara ei;
- se spală mâinile înainte și după operații, iar părul se leagă;
- se controlează emisiile de aer, se sterilizează incinta cu lămpi UV.

15.1.4. Mediile de cultură celulară

Mediile de cultură celulară trebuie să asigure:

- echilibrul ionic obținut cu soluții izotone (păstrarea continuă a presiunii osmotice);
- pH optim, ($\text{pH} = 7,2 - 7,4$) menținut cu substanțe tampon (tampon fosfat, tampon bicarbonat de sodiu - CO_2); în mediu există și un indicator de pH (roșu fenol - virează de la galben la roșu aprins și apoi violaceu);
- temperatură optimă, conținutul de oxigen și de CO_2 favorabil;
- elemente nutritive, indispensabile metabolismului: hidrați de carbon (glucoza), proteine animale, (lichidele biologice cu plasmă, ser sanguin, lichid amniotic) și aminoacizi esențiali, grăsimi (colesterol și cefalină), vitamine (A, B), hormoni, substanțe stimulatoare ale creșterii;
- evitarea contaminării cu germeni patogeni prin adăugarea de antibiotice (penicilină, streptomycină) și antifungice (micostatin, staminin);
- stimularea multiplicării și creșterii celulelor prin adăugarea de extracte embrionare;

Mediile de cultură se clasifică după mai multe criterii:

- a. după consistență: - lichide, semilichide (mediu nutritiv + agar sau coagulant plasmatic sanguin);

b. după compoziție: - naturale, semisintetice (soluții sintetice - AA, soluție salină, vitamine și componenți naturali, ser, plasmă, extract embrionar), sintetice;

c. după valoarea nutritivă și după scopul urmărit: - medii de creștere (permit o proliferare abundentă a celulelor de cultură), medii de menținere (păstrează activitatea celulelor, fără a le favoriza proliferarea, utilizate pentru întreținerea culturilor ajunse la dezvoltare maximă).

Mediile nutritive conțin:

1. o soluție salină (soluție tampon + indicator);
2. elementele proteice (ser, plasmă, lichid amniotic, aminoacizi);
3. elemente stimulatoare ale creșterii (extracte tisulare de origine embrionară sau adultă);
4. vitamine;
5. antibiotice;

15.1.5. Tehnica culturii celulare

Toate etapele culturii celulare respectă riguros regulile de asepsie.

Recoltarea se face din cele mai variate țesuturi provenite de la om, animal, insecte sau plante. După proveniența lor, țesuturile ce urmează a fi cultivate se împart în:

a. țesuturi normale:

- embrionare (se cultivă ușor, creștere rapidă);
- adulte (medii complexe, creștere lentă precedată de un timp de latență de 6-10 zile);

b. țesuturi tumorale.

Recoltarea trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să evite contaminarea țesuturilor cu microorganisme prin respectarea riguroasă a asepsiei;
- să se evite traumatizarea în timpul recoltării și în cursul manevrelor ulterioare;

- să se realizeze cât mai curând după deces;

- de la recoltare și până la prepararea culturii, țesutul se păstrează la rece (la $+4^{\circ}\text{C}$), într-o soluție salină cu antibiotice, timp de 3-4 ore. Dacă culturile nu se pot face în acest timp, țesutul se spală și se taie la 1-3 mm, se păstrează la 4°C , în mediu nutritiv, în flacoane ermetice cu dop de cauciuc. Apoi se spală în băi de soluție salină cu antibiotice și se urmărește înlăturarea cheagurilor de sânge și a porțiunilor inutilizabile. Tehnica de lucru pentru diferite țesuturi este următoarea:

A. Pentru *țesuturi embrionare umane* recoltarea se face de la embrioni de 1-3 luni. Se evită excesul de dezinfectante. Embrionul se depozitează într-un cristalizor steril, cu capac, ce conține o soluție salină cu antibiotice. Astfel ambalați, embrionii sunt trimiși în cel mai scurt timp la laborator.

Tegumentul embrionului trebuie considerat contaminat; sterilizarea lui se face cu alcool iodat, având grijă ca antisepticul să nu pătrundă în cavitățile embrionului după incizarea lui. Cu pense sterile, se aleg fragmente de țesut embrionar, îndepărtând cu atenție cheagurile de sânge; fragmentele curate se trec în altă cutie Petri sterilă cu soluție salină. Transvazarea fragmentelor se repetă de 2-3 ori și de fiecare dată se folosesc alte instrumente sterile; prin transvazările succesive se elimină cheagurile de sânge și porțiunile de țesut neutilizabile (strivite).

După ultima spălare, fragmentele se pun într-o epubretă de centrifugă sterilă și cu ajutorul unor foarfeci sterili bine ascuțiți se obține o masă cu aspect omogen. Dacă dispersarea mecanică nu dă rezultate bune, celulele se separă sub acțiunea tripsinei și agitării. Acțiunea tripsinei se oprește prin răcirea soluției și apoi celulele se separă de soluția de tripsină prin centrifugare; celulele se resuspendă în mediul nutritiv și se efectuează numărarea lor cu camera de numărat. În final celulele se introduc în vase de cultură.

Cu o pipetă Pasteur sau cu o ansă sterilă se ia o cantitate din suspensia de țesut embrionar și se întinde pe una din suprafețele unui recipient de cultură, steril, făcându-se o repartizare cât mai uniformă a suspensiei. Recipientul, cu fața pe care este întinsă suspensia situată în jos, se lasă la temperatura camerei sau la termostat la 37°C, timp de 30-60 minute.

După trecerea acestui timp se introduce mediul nutritiv, având grijă ca el să nu antreneze fragmentele de pe sticlă. Recipientele sunt astupate cu dop de cauciuc și incubate într-un termostat la 37°C. În timpul incubării, recipientele nu trebuie mișcate din loc cel puțin 3-4 zile.

Metoda este analogă și la recoltarea de placentă umană, de țesuturi embrionare animale și de țesuturi embrionare de pui (vezi fig. 77).

B. Pentru *țesuturi adulte* provenite prin intervenție chirurgicală (piele, mucoase, mușchi, țesut uterin, rinichi, splină și ganglioni, măduvă osoasă, amigdale, apendice, tiroidă). Fragmentele recoltate se introduc în soluție salină cu antibiotice, unde se lasă 2-3 ore și apoi se efectuează etapele de prelucrare preliminară identice cu ale embrionului.



Fig.77. Tehnica culturii de celule pentru țesuturi embrionare de pui.

C. Pentru țesuturi tumorale.

D. Pentru țesuturi vegetale.

15.1.6. Controlul culturii

Controlul culturii trebuie realizat înaintea oricărui experiment. El se poate realiza prin:

1. Controlul mediilor:

- control pentru contaminanți (bacterii, fungii, micoplasme, viruși);
- control al constantelor fizico-chimice (pH, proteine totale);

- control de eficiență, aprecierea densității celulare pe suprafața suportului, evaluarea eficienței de formare a coloniilor celulare.

2. Controlul morfologic (aspectul morfologic al celulelor în cultură).

a. tehnici de microscopie fonică:

- examinarea celulelor în stare vie la microscopul cu contrast de fază (aprecierea formei celulelor, a gradului de granularitate a citoplasmei, a conturului nucleului);

- examinarea preparatelor fixate și colorate;

b. tehnici de histoautoradiografie.

c. tehnici de microscopie electronică.

15.2. CRIOFRACTURAREA

Una din problemele majore în analiza și vizualizarea preparatelor biologice prin tehnicile de microscopie o constituie prevenirea artefactelor.

Există părerea în lumea științifică că structurile observate la microscopul electronic nu sunt identice cu starea lor nativă din organismul viu, și deci starea lor biostructurală ar putea fi modificată. Aceste artefacte ar fi urmarea folosirii metodelor convenționale de prelucrare bazate pe fixarea chimică și apoi pe includerea preparatelor biologice.

În urma cercetărilor efectuate la începutul deceniului șase de către Hans Moor și Russell Steere a fost dezvoltată o tehnică ingenioasă numită replicarea prin crio fracturare (freeze-fracture replication). Experiențele efectuate la sfârșitul anilor '40 asupra celulelor prin introducerea unor compuși cum ar fi glicerolul urmate de răciri la temperaturi joase, -150°C , au arătat că celulele ar putea fi înghețate fără formarea cristalelor de gheață.

Procesul de cristalizare intracelulară la viteze mici, atunci când celulele sunt înghețate în apă, produce moartea celulelor. În cazul unor viteze de înghețare ridicate de aproximativ 10.000°C/s apa conținută capătă o structură solid - amorfă, țesuturile devenind astfel vitroase, păstrând astfel viabilitatea lor. Pe de altă parte, fenomenul de înghețare rapidă la nivel celular este limitat de conductivitatea termică relativă a apei conținute, care micșorează deci rata înghețării rapide a probei. În tehnicile de înghețare, dezvoltate recent, proba este așezată pe suprafața unei piese metalice, din cupru pur, care a fost răcit la temperatura heliului lichid, 3°K (-270°C).

Conductivitatea termică este suficient de rapidă, în acest caz, pentru a realiza înghețarea straturilor de celule în intervalul a 2 ms, stopând astfel cele mai rapide activități celulare.

Prepararea unui țesut în vederea examinării prin microscopie

electronică presupune, odată realizată înghețarea celulelor, secționarea probei urmată de realizarea unei replici de platină - carbon care va evidenția, în urma iluminării cu un fascicul de radiații X, detaliile morfostructurale analizate.

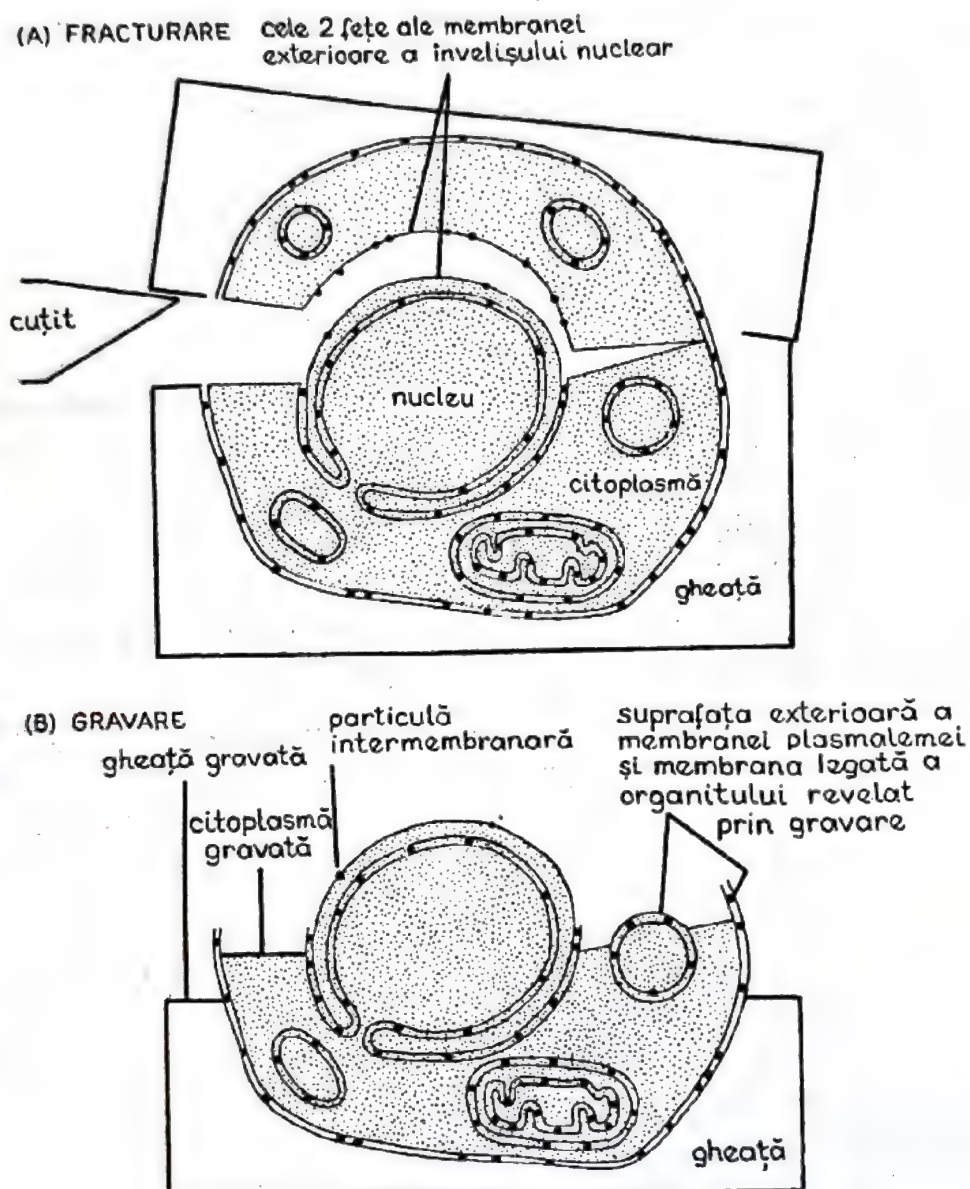


Fig.78. Schema obținerii unei crio fracturi.

Țesuturile înghețate instantaneu sunt secționate cu ajutorul unui crioultramicrotom, un cuțit răcit la temperaturi sub -190°C , cu azot lichid (vezi fig.78.A), gheața din probă fiind apoi îndepărtată printr-un proces de sublimare în vid. Țesutul fracturat astfel (fig.78.B) este pregătit apoi pentru realizarea replicii de platină carbon (fig.79).

În figura 80 se observă că în urma fracturării, suprafața probei prezintă neuniformități datorate particulelor și formelor diferite ale

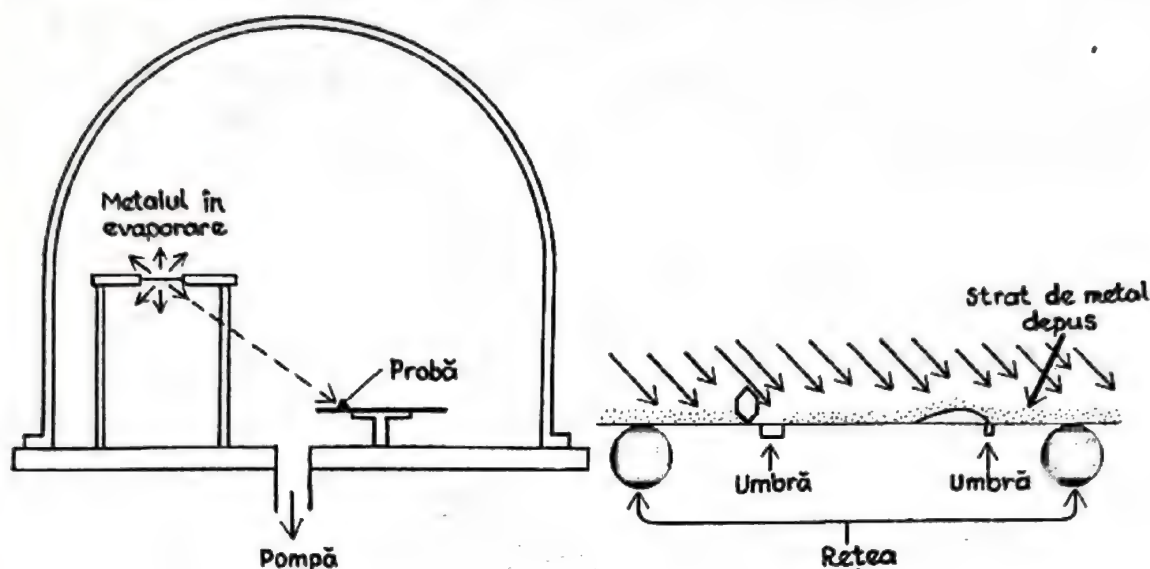


Fig.79. Schema instalației de sublimare și metalizare a crio fracturării.

organitelor prezente în celule, care sunt acoperite apoi în procesul de umbrire și replicare a probei.

Replikele obținute permit înțelegerea modului de asamblare a biostructurilor, pe baza imaginilor tridimensionale furnizate în urma explorării electronomicroscopice.

Tehnicilor imaginate de Steere și Moore li s-au adăugat cele obținute în urma studiilor făcute de Mosely, Chalcroft și Bullivant, Collins, Wehrli și colab. Tonasaki și Yamamoto. Replica materialului biologic astfel obținut, în urma crio fracturării și sublimării în vid, are avantajul că evită etapele obișnuite de fixare și includere păstrând fidelitatea biostructurilor native.

Practic, condițiile speciale de lucru au condus la realizarea unei aparaturi specializate care se prezintă ca o incintă în care se găsesc: crioultramicrotomul, sistemul de refrigerare cu piesa din cupru pur pe care se așează materialul biologic, sursele de evaporare a cadmiului și carbonului, totul fiind vizibil și mărit în exterior prin intermediul unui microscop.

Evident, un sistem de vidare de 10^{-6} - 10^{-7} torr și sistemele electronice pentru controlul temperaturilor și al grosimilor depunerilor vor asigura buna funcționalitate pe timpul efectuării preparatelor.

Această metodă de crio fracturare a materialului are avantajul că permite vizualizarea unor structuri, ca partea internă a membranelor unitare,

care în mod normal nu sunt accesibile prin tehnicile de ultramicrotomie clasică. Unele tehnici de crioultramicrotomie utilizează o impregnare a ţesuturilor cu crioprotectori (ex. glicerina 20-30%). Agenţii crioprotectori se aplică ţesuturilor a căror structuri depăşesc un conţinut de apă de 70%.

Diverşi autori nu recomandă utilizarea de agenţi crioprotectori, atunci când conţinutul de apă din structurile ţesutului este sub 70%.

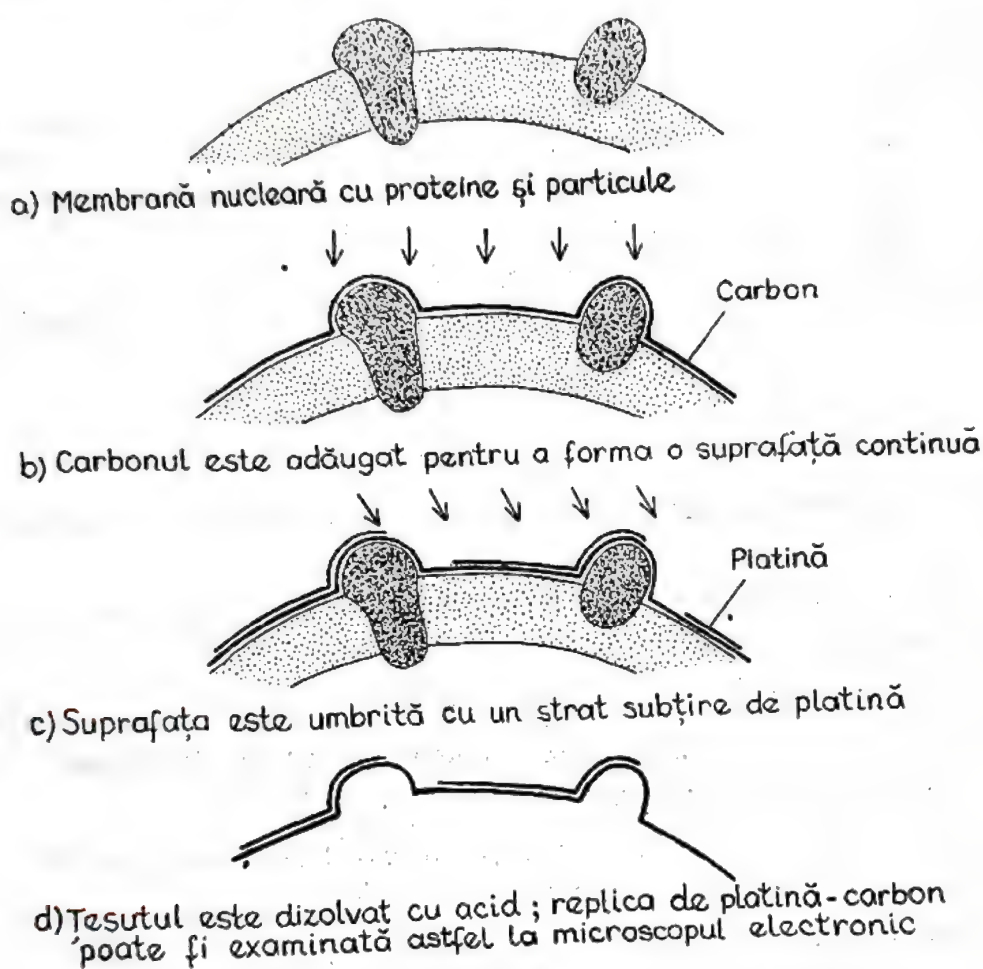


Fig.80. Obţinerea replicii de platină - carbon a probei crio fracturate.

15.3. FRACTIONAREA CELULARĂ

În timp ce se pot determina formele organelor şi a agregatelor mari macromoleculare din cadrul celulelor şi a ţesuturilor, ba chiar şi poziţia specifică a moleculelor, în urma investigării prin tehnici de microscopie fonică şi electronică, înţelegerea mai detaliată, din punct de vedere molecular, a celulei, necesită efectuarea de analize biochimice mai profunde.

De multe ori aceste analize au nevoie, pentru o mai clară evidenţiere, de fragmentarea parţială sau totală a celulei, ceea ce a dus la dezvoltarea, în

timp, de către biologi, a unei tehnici de rupere a ţesuturilor şi celulelor, într-un mod controlat. Fraţionarea celulară este tehnica care implică omogenizarea sau distrucţia legăturilor celulelor prin diferite procedee mecanice sau chimice, separarea fracţiunilor celulare fiind făcută în funcţie de densitate şi volum. Tehnica de centrifugare diferenţiată constă în faptul că particulele de diferite mărimi se vor deplasa către partea de jos, dar în zone diferite, ale unui tub centrifugal, când sunt plasate în câmpul de centrifugare la diferite viteze de rotire.

Deoarece este esenţială izolarea unor cantităţi de organite celulare în vederea studiului lor structural, primul pas efectuat în procesul de purificare a structurilor subcelulare îl constituie ruperea peretelui celular sau a membranei plasmatică. Astfel, mai întâi celulele sunt suspendate într-o soluţie conţinând o sare cu un pH apropiat, cum ar fi sucroza izotonică, sau conţinând săruri similare care s-ar găsi în interiorul celulei. "Spargerea" membranei se realizează fie prin agitarea suspensiei celulare cu o viteză foarte mare într-un "malaxor" (centrifugare), fie expunerea sa într-un câmp sonic de înaltă frecvenţă (ultrasonare). În figura 81 prezentăm protocolul desfăşurat în procesul de fracţionare celulară.

Sedimentarea particulelor (a) va continua atât timp cât ele vor fi supuse la centrifugare, şi asta deoarece mediul (suspensia) este mai puţin dens decât particulele. În figura 81.b mediul este compus dintr-un gradient de densitate, de aceea particulele se vor mişca până ce ele vor ajunge într-o zonă a tubului (eprubetei) egală cu propria lor densitate, unde vor forma nişte benzi.

Centrifugarea în "rată zonală" nu produce fracţionări pure în totalitatea lor, ale organitelor celulare. La centrifugarea în gradient de densitate la echilibru, organitele sunt separate după densitate, nu şi după mărimea lor. Fraţiunea impură de organit este stratificată în partea superioară a soluţiei care conţine gradientul unei substanţe neionice, ca de exemplu sucroza sau glicerolul. Cea mai densă (concentrată) parte din soluţie este concentrată în partea de jos a tubului centrifugal (unde soluţia tipică de sucroză este de aproximativ $1,25 \text{ g/cm}^3$). Concentraţia descreşte în mod gradual către vârful eprubetei, astfel încât la suprafaţa ei se va găsi cea mai slabă concentraţie.

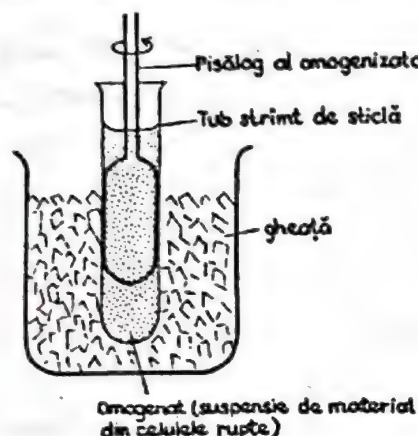
Viteza de centrifugare a eprubetei în care se găseşte conţinutul iniţial se face la viteze mari de aproximativ 40000 r/min, timp de câteva ore, ceea ce va permite fiecărei particule să migreze la o poziţie de echilibru. Se ajunge astfel la echilibrul între densităţile lichidului cu ale particulei, nemaifiind posibilă o separare mai mare. Astfel, în preparatele obţinute din

tesuturile de animale, găsim reticuli endoplasmatici rușoși având densități de $1,2 \text{ g/cm}^3$, și care sunt bine separați față de complexul Golgi (densitate de $1,14 \text{ g/cm}^3$) sau de membranele plasmatice (densitate de $1,12 \text{ g/cm}^3$).

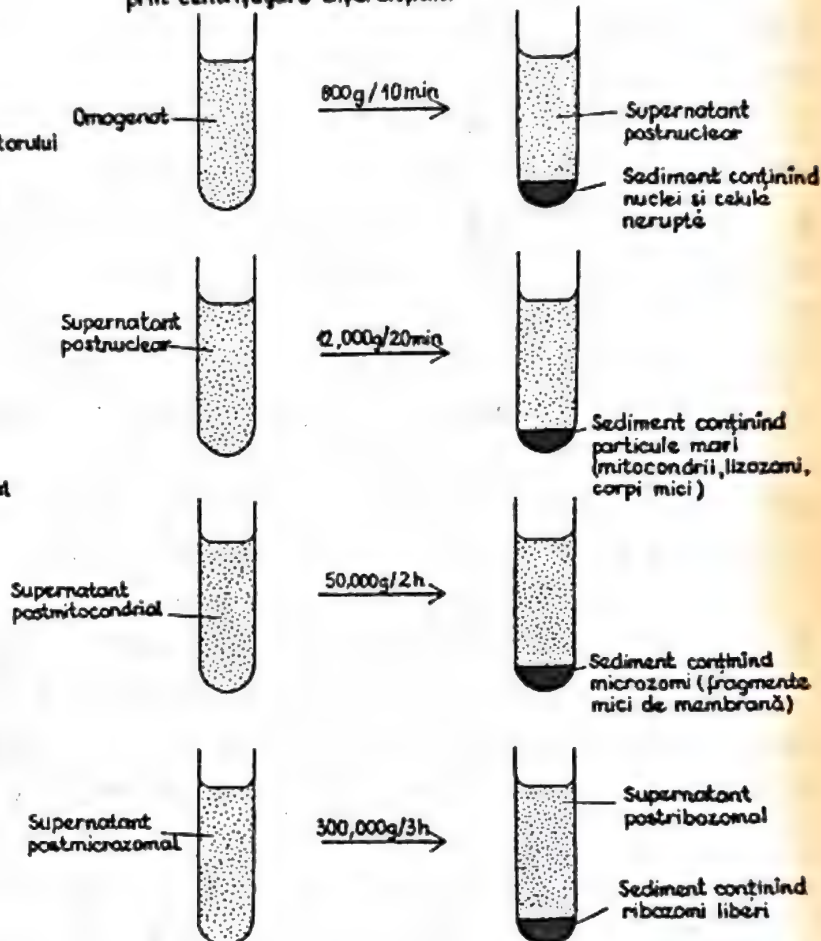
(a)

Pasul 1. Tesut recătat. Măruntit cu lama în bucăți mici. Suspendat în mediu izotonic de omogenizare rece (ex: sucroză $0,25 \text{ M}$)

Pasul 2. Omogenizarea fragmentului de țesut



Pasul 3. Izolarea componentelor subcelulare din homogenat prin centrifugare diferențială



(b)



Fig.81. Fraționarea celulară. a. pașii de omogenizare și fracționare inițială prin centrifugare diferențiată; b. înaltă purificare prin centrifugare în gradient de densitate.

În figura 82 ilustrăm o astfel de separare pentru cazul lizosomilor, mitocondriilor și al peroxisomilor.

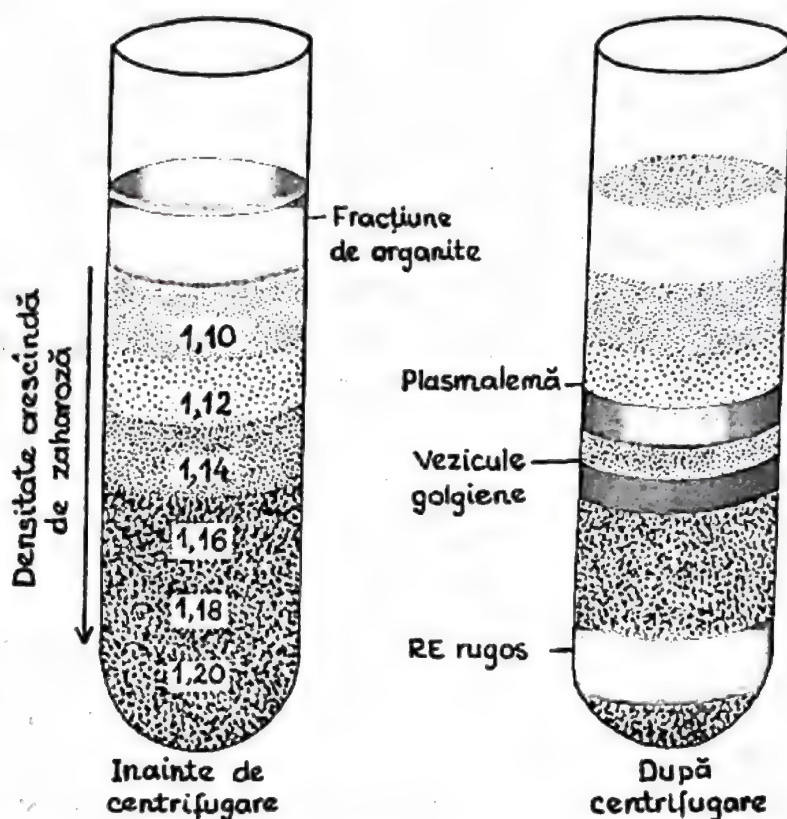


Fig.82. Separarea organelor celulare prin centrifugare în gradient de densitate, la echilibru (ca material biologic este folosit ficatul de șobolan).

Materialul găsit în faze (v. fig.82 - inelele de sediment formate în eprubetă) este rezultat în urma separării prin centrifugare cu rată de 15000 g. Sub centrifugare, fiecare organit celular (mitocondrie, liposom sau peroxisom) migrează și apoi rămâne la densitatea de echilibru apropiată lui.

În cazul experimentului de mai sus, ficatul de șobolan se perfuzează cu o soluție conținând o mică cantitate de detergent, luată de celule prin endocitoză și transferată lizosomilor, fără lizarea lor. Astfel, lizosomii devin mai puțin denși decât ar fi normal ei să fie, ceea ce permite separarea lor netă față de mitocondrii. De asemenea această tehnică la echilibru, poate fi utilizată cu succes pentru separarea diferitelor tipuri de nuclee sau nucleoproteine.

15.4. CROMATOGRAFIA

Metoda cromatografică a fost introdusă prima oară în analiza chimică de către botanistul rus Mihail Tvet în anul 1903, în cadrul studiului compoziției unor coloranți vegetali. Trecând produșii clorofilici printr-o coloană umplută cu carbonat de calciu, fin divizat, și supunând coloana unor percolări repetate cu eter de petrol, s-au obținut zone distincte, diferit colorate, corespunzătoare constituienților acestor produse.

Această metodă de separare, având la bază migrarea diferențială a componentilor unui amestec de analizat de-a lungul unei coloane umplută cu fază staționară adecvată sub acțiunea unei faze mobile, a primit numele de cromatografie (scriere cu culori), denumire ce a rămas consacrată pentru toate tehnicile ce funcționează pe același principiu, chiar când ele tratează substanțe incolore.

Deci cromatografia este o metodă de separare de mare performanță ce reunește o serie de metode de analiză bazate pe separarea componentelor unei probe, prin migrarea lor diferențiată între două faze, dintre care una este staționară, cealaltă mobilă. Migrarea diferențiată este o consecință a vitezelor diferite cu care componentii amestecului antrenati de faza mobilă se deplasează de-a lungul fazei staționare, în coloana cromatografică sau un echivalent al acestuia, hârtie cromatografică sau strat subțire depus pe o placă.

Caracteristicile metodei cromatografice sunt:

- capacitatea de rezoluție foarte mare, concretizată în posibilitatea separării unor amestecuri speciale de componente asemănători;
- sensibilitate remarcabilă;
- universalitatea domeniilor de aplicare;
- simplă, accesibilă, rapidă;

15.4.1. Clasificare

1. În funcție de mecanismul ce stă la baza procesului elementar de separare și după natura celor două faze, metodele cromatografice se clasifică în felul următor:

- a. cromatografie de adsorbție - cromatografie lichid-solid
 - cromatografie gaz-solid
- b. cromatografie de repartiție - cromatografie lichid-lichid
 - cromatografie gaz-lichid
- c. cromatografie prin schimb ionic

d. cromatografie de excludere-difuzie

2. În funcție de natura fazei staționare și de natura fazei mobile avem:

a. fază staționară solidă

- fază mobilă solid-lichid - cromatografie de adsorbție pe coloană
 - cromatografie pe strat subțire
 - cromatografie prin schimb ionic

- fază mobilă gazoasă solid-gaz

b. fază staționară lichidă

- fază mobilă lichidă lichid-lichid - cromatografie de repartiție pe coloană
 - cromatografie pe hârtie
 - cromatografie de excludere-difuzie
 - cromatografie pe strat subțire
- fază mobilă gazoasă lichid-gaz - cromatografie de repartiție pe coloană
 - cromatografie pe coloane capilare

15.4.2. Separarea proteinelor prin cromatografie

Una din cele mai utilizate metode de tracționare a proteinelor implică cromatografia, tehnică ce a fost utilizată inițial pentru fracționarea compușilor cu greutate moleculară mică, precum zaharurile și aminoacizii.

Cel mai utilizat tip de cromatografie pentru separarea moleculelor mici este cromatografia de partiție; o picătură de probă este aplicată pe un suport, cum ar fi o bucată de hârtie absorbantă (în cromatografia de hârtie) sau o bucată plastic sau sticlă acoperită cu un strat subțire de material absorbant inert, cum ar fi celuloza sau gelul siliconic (cromatografia în strat subțire). Unui amestec de solvenți, cum ar fi apa și alcoolul, îi este permis să pătrundă în bandă dintr-un capăt. Pe măsură ce solvenții se mișcă de-a lungul benzii, ei antrenează moleculele probei în solvenții respectivi.

Solvenții sunt selectați astfel ca unul din ei să fie absorbit mai puternic pe materialul absorbant decât celălalt. În acest timp, moleculele care sunt mai solubile în solventul absorbit sunt relativ întârziate, în timp ce acelea care sunt mai solubile în celălalt solvent se mișcă mai rapid. Pentru a detecta localizarea diferitelor molecule, cromatograma este uscată și apoi colorată.

Se folosesc pe scară largă, pentru analiza diferitelor molecule mici, diverse forme cromatografice pe hârtie și în strat subțire. După ce proba a fost aplicată la bază și uscată, o soluție conținând un amestec de doi solvenți a fost trecută încet prin hârtie prin acțiune capilară. Diferitele componente

din probă se mișcă la rate diferite în hârtie conform solubilității lor relative în solventul absorbit preferențial de hârtie (vezi fig. 83).

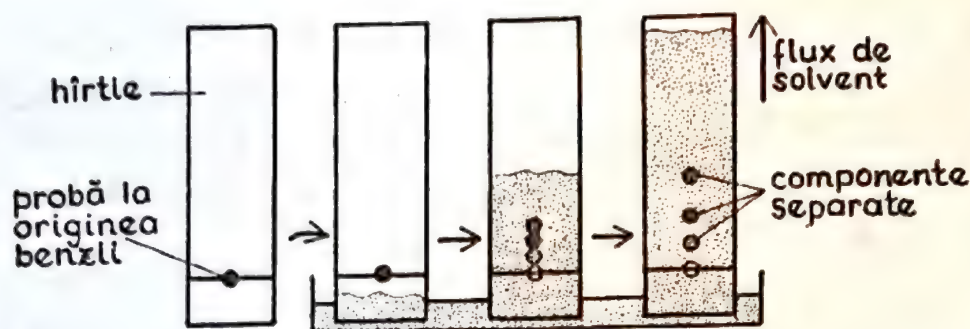


Fig.83. Separarea moleculelor mici prin cromatografie pe hârtie.

Proteinele sunt adeseori fracționate prin cromatografie pe coloană, în care acestea se trec peste o coloană ce conține un material poros, solid și diferitele proteine sunt întârziate la rate diferite prin interacțiunea lor cu matricea. În acest mod, diferitele proteine pot fi colectate separat pe măsură ce scurg pe la baza coloanei. Proba este aplicată la capătul unei coloane cilindrice din sticlă sau plastic, conținând o matrice solidă permeabilă, imersată în solvent. Prin colană se pompează lent o cantitate mare de solvent ce este colectată în tuburi separate pe măsură ce iese prin baza coloanei.

Diferiți componenți ai probei traversează prin coloană cu viteze diferite și sunt astfel fracționați (fig. 84).

S-au dezvoltat multe tipuri de matrici ce permit proteinelor să fie separate fără alterarea structurii lor native. Aceste matrici fac diferență între diferitele proteine pe baza sarcinii electrice, mărime sau capacitatea lor de a se lega de grupări chimice particulare pe matrice.

Sunt disponibile multe tipuri de matrici pentru acest scop. Coloanele cu schimbători de ioni conțin suporturi de săruri negative sau pozitive, astfel că proteinele sunt fracționate în conformitate cu aranjamentele sarcinilor electrice pe suprafața lor. În cromatografia pe schimbător de ioni, matricea insolubilă poartă sarcini ionice ce întârzie moleculele de sarcină opusă.

Matricele utilizate de obicei pentru separarea proteinelor sunt dietilaminoetilceluloză (DETAE-celuloză), care sunt încărcate pozitiv și carboximetilceluloza (Cm-celuloza) și fosfoceluloza, care sunt încărcate negativ.

Tăria asocierii între moleculele dizolvate și matricea schimbătoare de ioni depinde de gradul ionic și de pH-ul soluției de eluție, care poate fi de altfel variat într-un mod sistematic pentru a obține o separare efectivă

(fig. 85).

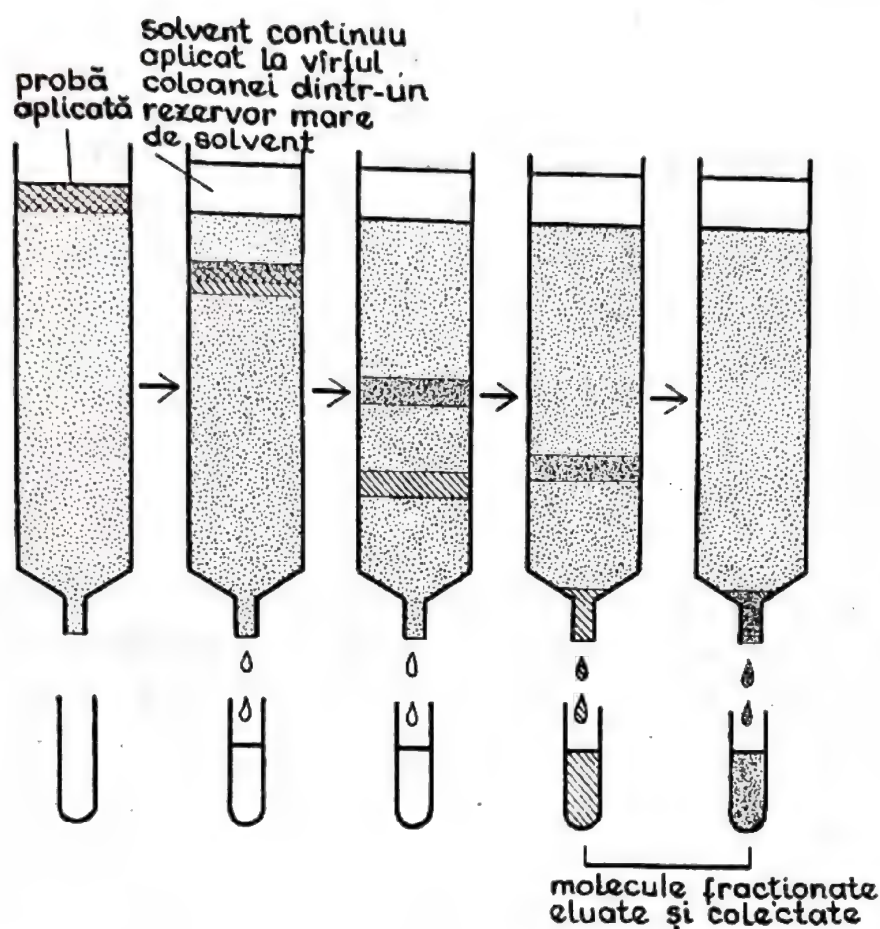


Fig.84. Separarea moleculelor prin cromatografie pe coloană.

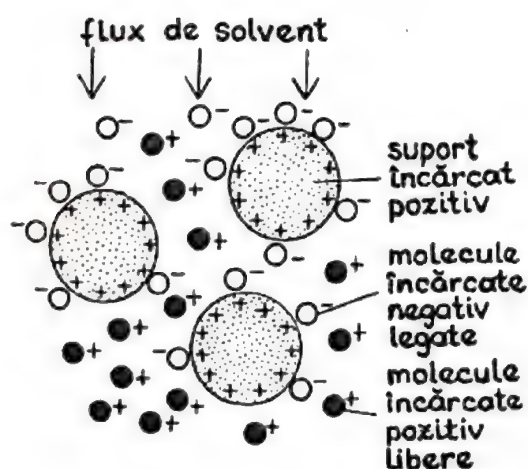


Fig.85. Schema matricii cromatografice în cromatografia pe schimbător de ioni.

Coloanele de filtrare pe gel conțin paturi poroase minuscule și separă proteinele conform mărimii lor; moleculele care sunt destul de mici și trec prin pori, pătrund în interiorul straturilor succesive și călătoresc prin ele, în

timp ce moleculele mari rămân între straturi și astfel moleculele mici se mișcă mai rapid prin coloană, extrăgându-se primele. Cromatografia de filtrare pe gel este un mod convenabil de a determina mărimea moleculelor de separat.

O proteină particulară nu poate fi, de obicei, separată dintr-un amestec într-un singur pas, prin cromatografie pe coloană, din cauză că fiecare pas crește în general proporția proteinei într-un amestec nu mai mult de 20 de ori. Deoarece majoritatea prbteinelor reprezintă mai puțin de 1/1000 din proteinele celulare totale, este de obicei necesar să folosim diferite tipuri de coloane succesive pentru a le purifica. În cromatografia de filtrare pe gel, matricea este inertă dar poroasă. Moleculelor care sunt destul de mici pentru a intra în matrice le corespunde un volum mai mare al solventului ce le este disponibil și din această cauză se deplasează mai încet prin coloană.

Din punct de vedere comercial sunt disponibile într-o paletă variată suporturi de polizaharide (dextran sau agaroză) cu diferite mărimi de pori, suporturi potrivite pentru fracționarea moleculelor cu diferite greutatea moleculare (de la mai puțin de 500 până la peste 5×10^6)(fig.86).

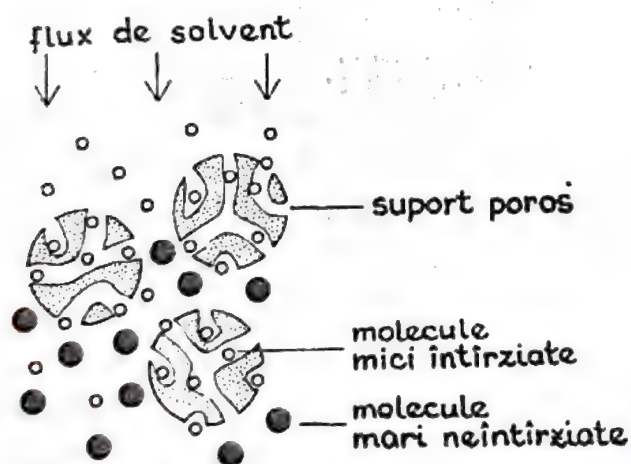


Fig.86. Schema matricii cromatografice în cromatografia de filtrare pe gel.

Un procedeu mult mai eficient, cunoscut drept cromatografie de afinitate, are avantaje cu privire la interacțiunile biologice de legare ce apar la suprafața proteinelor. De exemplu, dacă un substrat enzimatic este cuplat covalent de o matrice inertă, de exemplu un suport polizaharidic, enzimele pot fi adeseori reținute de matrice împreună cu foarte puține alte proteine.

Într-un mod similar, anticorpi specifici pot fi cuplați de o matrice, care poate fi folosită atunci pentru a purifica moleculele recunoscute de anticorpi. Din cauza mării specificități a unor asemenea coloane de afinitate, pot fi obținute purificări de 1000-10000 ori într-un singur pas prin coloană.

Cromatografia de afinitate, utilizează o matrice insolubilă, legată covalent de un ligand specific, cum ar fi o moleculă de anticorp sau un substrat enzimatic, ce va lega o proteină specifică. Sunt realizate purificări într-un singur pas printr-o asemenea coloană de afinitate (fig. 87).

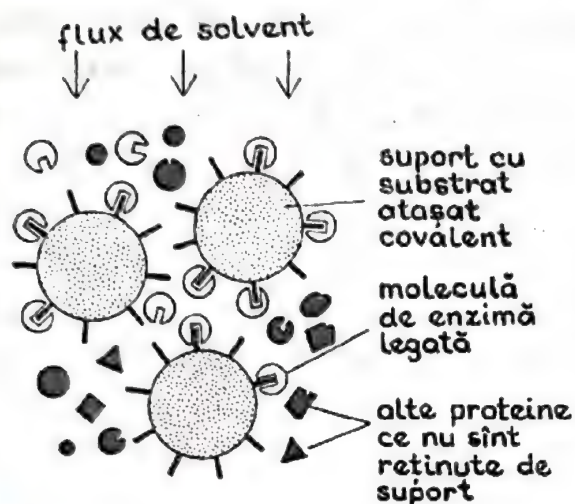


Fig.87. Schema matricii cromatografice în cromatografia de afinitate.

15.5. ELECTROFOREZA

Electroforeza, una din cele mai utilizate tehnici de biologie celulară și moleculară din ultimile decenii, și-a adus contribuții majore la dezvoltarea bazei informaționale atât pentru nivelele macromoleculare mari, cazul proteinelor și al acizilor nucleici, cât și pentru cele de dimensiuni mai reduse, cazul monomerilor cum ar fi aminoacizii și nucleotidele, blocuri - unități de structură ale primelor.

Prin tehnicile de electroforeză se realizează purificarea și fracționarea macromoleculară, și chiar dacă ele se prezintă într-o largă varietate, toate depind de abilitatea moleculelor încărcate cu o sarcină de a migra către un câmp electric. În funcție de natura sarcinii, pozitivă sau negativă, ele migrează către un catod sau anod. Lungimea deplasării, în timpul migrației proteinei, depinde de masa moleculară și sarcina ei, cât și de pH-ul mediului, făcând astfel posibilă separarea în condiții optime a diverselor tipuri de molecule care s-ar putea găsi în amestecul de studiat.

Dintre toate tehnicile de electroforeză folosite, cel mai mult s-au impus acelea care utilizează gelul poliacrilamidic sau din agaroză, medii propice separărilor de proteine și acizi nucleici, datorită abilității moleculelor de a migra în prezența unui gradient de câmp electric. Printre avantajele utilizării gelului menționăm: reproductibilitatea lui, puterea de rezoluție mare, posibilitatea de control a mărimii porilor pe un domeniu mare de

dimensiuni, inerția și stabilitatea chimică la variații mari de pH, temperatură și concentrație ionică, transparență perfectă, rezistență mecanică și flexibilitate.

Gelul de poliacrilamidă (PA) se obține prin copolimerizarea acrilamidei și a N,N' - metilenbisacrilamidei.

Monomerii de acrilamidă formează lanțuri lungi "reticulate" prin intermediul bisacrilamidei. Polimerizarea este inițiată de AP sau riboflavină și accelerată de N, N, N'N' - tetrametilendiamină (TEMED). El catalizează formarea de radicali liberi din persulfat, care, la rândul lor, inițiază polimerizarea. Creșterea concentrației acceleratorului sau inițiatorului determină creșterea vitezei de polimerizare, O_2 fiind inhibitor al polimerizării, pentru îndepărtarea sa, amestecul de polimerizare se degazează înainte de adăugarea TEMED-ului (riboflavina se descompune sub acțiunea luminii și eliberează radicali liberi care inițiază polimerizarea). Prezența TEMED-ului este totuși necesară în anumite condiții, procesul de polimerizare fiind mai sigur.

În cazul proteinelor, gelurile poliacrilamidice pot fi preparate sub formă de straturi (plăci) netede (vezi fig.88) sau sub forma unor coloane cilindrice (fig.89).

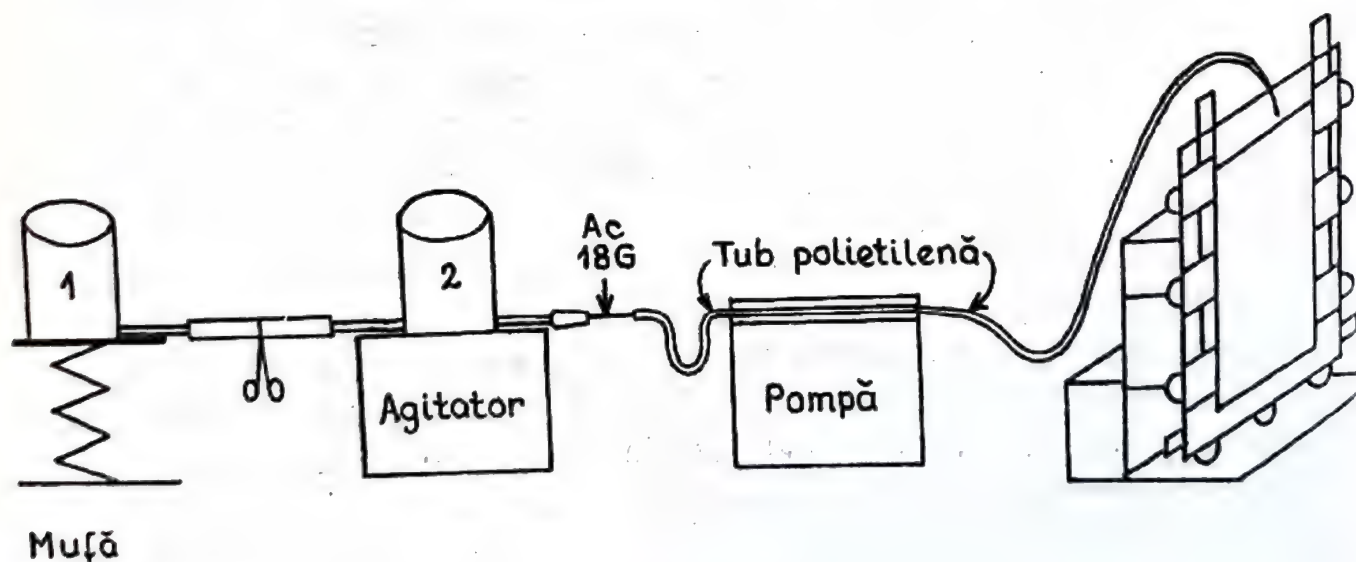


Fig.88. Schema unei instalații de electroforeză pe gel poliacrilamidic sub formă de plăci.

În figura 89.a se prezintă schema unui aparat de electroforeză pe gel poliacrilamidic în care se observă prezența unor tuburi din sticlă suspendate

între rezervoarele tampon, inferioare și superioare, care conțin gelul prin care vor migra moleculele proteice. Sistemele de tampon pot conține unul sau mai mulți agenți de disociere cum ar fi: detergenți ionici ca diodecilsulfat (SDS), uree.

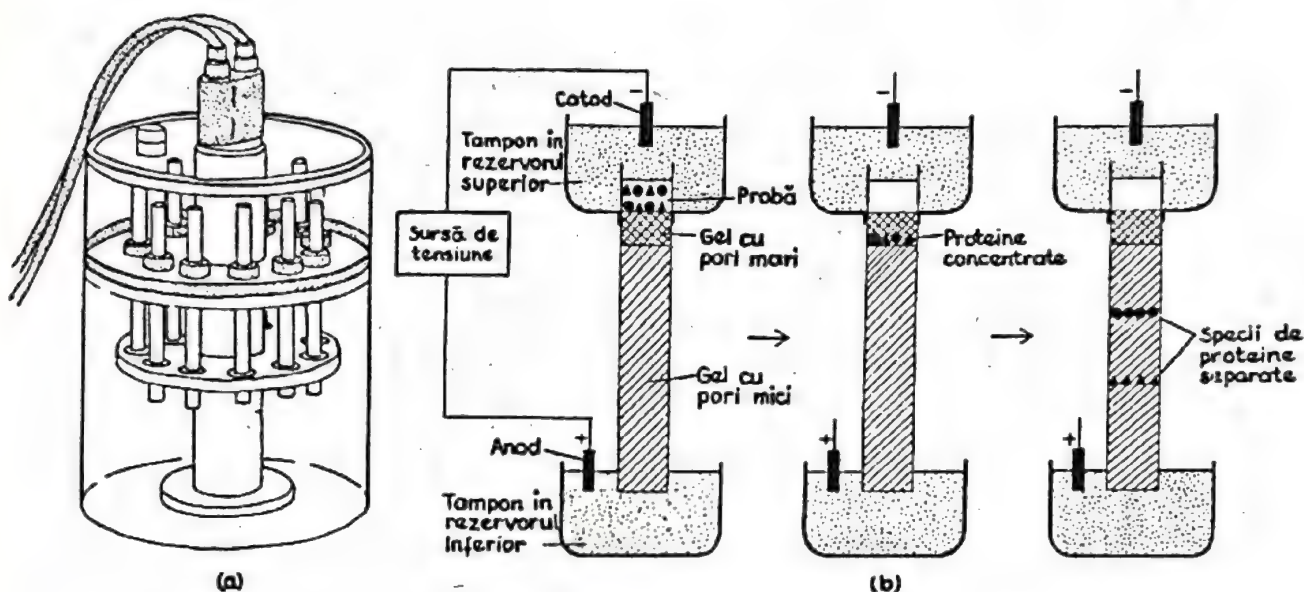


Fig.89. Schema unei instalații de electroforeză pe gel poliacrilamidic în coloane.

Figura 89.b prezintă diversele stadii ale moleculelor în procesul de separare: astfel înaintea polarizării, diversele specii de molecule se găsesc într-un amestec, cazul din stânga, odată cu aplicarea câmpului electric toate proteinele trec rapid prin porii gelului, cazul din mijloc, ca mai apoi, în cazul procesului de separare ele să se distanțeze datorită sarcinii electrice și masei moleculare specifice, cazul din dreapta. În cazul plăcilor se folosesc două tipuri de gel: unul de concentrare, având un pH acid și porozitate mare și altul de separare cu pH alcalin și porozitate mică, care se introduce în plăci ulterior, în partea superioară.

Soluția poliacrilamidică care se introduce în tubul de sticlă, polimerizează într-un gel semisolid la iluminarea sa cu o sursă în ultraviolet, creând astfel o anumită porozitate gelului. Concentrația soluției, din tuburi sau plăci, determină mărimea porilor în gel, și anume mărimea efectivă a porilor scade pe măsură ce concentrația de acrilamidă crește, și deci

facilitatea moleculelor de a putea traversa mediul poliacrilamidic.

Polimerizarea în absența bisacrilamidei dă naștere unei soluții vâscoase, iar adăugarea ei permite formarea unei rețele covalente; mărirea "ochiurilor rețelei" sau a porilor va scădea cu creșterea procentului de bisacrilamidă, atingând o valoare minimă când bisacrilamida este mai mare de 5%.

Gelului i se aplică o diferență de potențial, făcând posibilă migrarea moleculară. Pentru a putea observa diferitele tipuri de proteine sau acizi nucleici care datorită masei moleculare sau sarcinii electrice diferite migrează în anumite benzi și care se localizează în mod diferit pe gel, moleculele specifice sunt în prealabil colorate sau marcate radioactiv.

Prin presarea unui film radiografic pe gelul uscat și expunere cu radiații X se obține un film în care apar benzi colorate în nuanțe de gri care reprezintă diverse tipuri de molecule. Filmul obținut astfel mai poartă și numele de film autoradiografic. Un alt mediu, la fel de răspândit după cum s-a arătat, pentru realizarea gelului este agaroză. În practică, concentrația de agaroză este cuprinsă între 0,6 - 1,5%.

Mărirea fragmentelor care ar putea fi separate, cu excepția condițiilor experimentale particulare (de exemplu cazul PFG-Pulse Field Gel), este cuprinsă între 0,5 și 20 kb. Gelul este turnat orizontal în aparatele care sunt transparente la radiațiile UV, astfel încât să fie posibilă, în mod periodic, migrația.

În cazul utilizării electroforezei pe gel de agaroză la separarea acizilor nucleici, între bazele acizilor nucleici se introduce bromura de etil, moleculă care nu prezintă fluorescență în mod spontan, dar care în cazul intercalării între bazele acizilor capătă o fluorescență oranj. După migrare, sub iluminare cu radiații în UV, ADN-ul este vizualizat în gel, sub formă de benzi. Pentru analiză se poate utiliza un film fotografic sensibil.

Electroforeza în câmp pulsator (PFG) utilizează un gel de agaroză în concentrații de 1 %, permițând separarea ADN-ului cu mărimi cuprinse între 50kb și câteva Mb. În acest tip de electroforeză orientarea și polaritatea vectorului câmp electric sunt schimbate de o manieră programabilă pe tot timpul procesului. Porii de agaroză nu sunt simetrici, molecula de ADN orientându-se în câmp electric cu o viteză în funcție de masa sa moleculară, la fiecare schimbare a polarității câmpului, molecula trebuind să se reorienteze. În acest caz rezultă o întârziere proporțională cu mărirea sa.

Metodele de electroforeză pe gel sunt mult utilizate astăzi în secvenționarea ADN-ului. Ele sunt folosite în diverse protocoale, dintre care se detașează cele după metodele Sanger sau Maxam și Gilbert. Există astăzi

încercări de simulare de electroforeză prin tehnici computerizate, care își propun să modeleze mișcarea de drift a particulelor sau dimensionarizarea porilor.

15.6. DIFRACTIA CU RAZE X

Odată cu abordarea structurii moleculare, utilizarea razelor X s-a dovedit a fi benefică și pentru biologia moleculară, imaginea în acest caz fiind una de difracție a cristalului substanței de analizat. Difracția cu raze X oferă rezoluții mai bune chiar decât cele mai sofisticate tehnici de microscopie electronică.

Utilizând radiații X cu lungimea de undă de aproximativ 1 Å (0,1 nm) pentru a genera imaginea difractată a unui cristal este posibil să se deducă pozițiile individuale ale atomilor unei molecule, ca unitate de structură cristalină. Imaginea obținută prin difracție cu raze X poate impresiona ușor emulsia unui film, făcând posibilă stocarea informației. Razele X au o putere de penetrare cu mult mai mare decât electronii, permițând astfel analiza unei probe stratificate.

Mai mult, informația obținută nu mai este distorsionată ca în alte tehnici unde este necesară prelucrarea materialului biologic. Imaginea de difracție produsă de către cristal este determinată de natura structurii lui, a pozițiilor pe care le ocupă atunci în planurile regulate ale rețelei. Astfel, se știe că dacă un fascicul de raze X, cu lungimi de undă distribuite uniform, cade pe un cristal (de exemplu clorură de sodiu) apar fascicule ce corespund interferenței produse de către centrii difractanți din care este format cristalul, după direcții bine definite.

Dacă aceste fascicule ar întâlni în drumul lor o placă fotografică, ele ar forma niște pete mai luminoase (petele Laue - după numele fizicianului Max von Laue, care a avut ideea de a folosi un cristal drept rețea de difracție pentru razele X), din a căror poziție și intensitate s-ar putea determina pozițiile atomilor în cristal în același mod în care am putea deduce structura unei rețele optice - profilul fantelor - printr-un studiu al pozițiilor și intensităților liniilor din figura de interferență (vezi fig. 90).

Structura unui cristal se prezintă la scara microscopică ca o rețea cu simetrie cubică (unul din cele mai răspândite aranjamente ale atomilor în solide), având ca cel mai mic element al arhitecturii cristalului laticia (celula unitate), în vârfurile căreia se găsesc plasați atomii corespunzători ai moleculei.

Latura unei astfel de latici în cazul cristalului NaCl este de

5,62737Å. Configurația arhitecturală depinde de natura legăturilor între atomi. Latticea este unitatea periodică fundamentală de difracție. Razele X sunt difractate mai ales de electroni, difracția pe nuclee fiind în cele mai multe cazuri neglijabilă. Din studiul *direcțiilor* fasciculelor de raze X difractate se poate găsi simetria de bază a unui cristal, iar din studiul *intensităților* se poate afla modul de distribuție al electronilor în celula unitate.

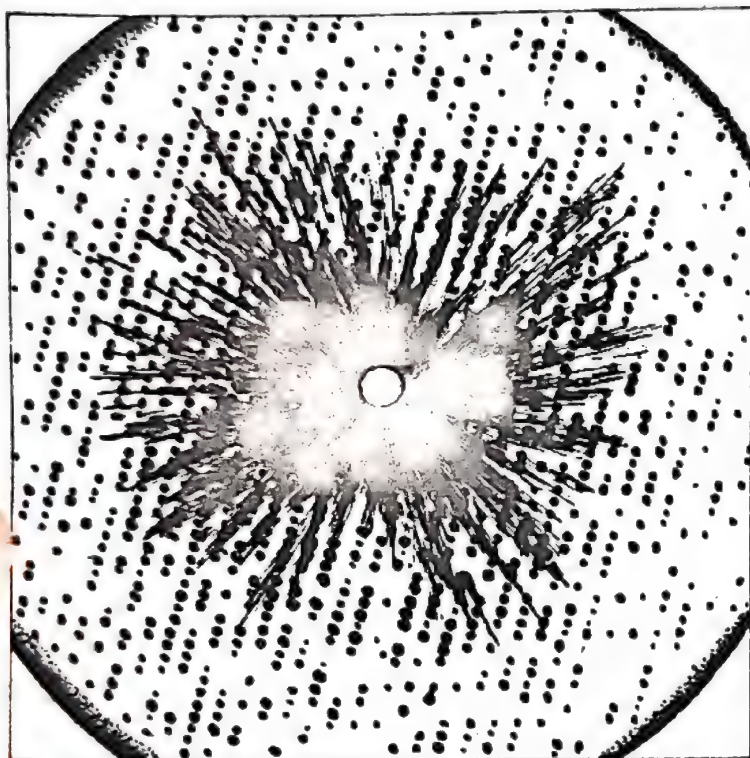


Fig.90. Imaginea de difracție X a unui cristal de mioglobină.

Dacă în microscopia electronică lentilele obiectiv colectează razele difractate și le recombina spre a forma imaginea probei, în cristalografia X recombinația făcută de cristalograf trebuie să fie bazată pe informația din: poziția spoturilor (reflexia), intensitatea lor de pe plăcile fotografice și fazele undelor, care sunt obținute pe baza comparării imaginilor produse în și fără metalele grele atașate proteinei.

S-a putut observa că atomii cu număr de ordine mai mare din tabelul Mendeleev, deci mai grei, cum ar fi C, N, O și P sunt mai repede detectați decât atomii de H. Din aceleași motive, oricare atom de metal, cum ar fi atomul de fier din molecula de hemoglobină, crează o lumină intensă a razelor X împrăștiate.

Datorită numărului imens de date culese printr-o imagine cristalografică, prelucrarea lor poate dura foarte mult timp, cum de altfel se

și întâmpla acum doar câteva decenii în urmă, ceea ce a dus la slaba lor utilizare. La ora actuală aceste date sunt analizate și prelucrate de computere cu programe soft ultraspecializate pentru prelucrarea tridimensională a informațiilor.

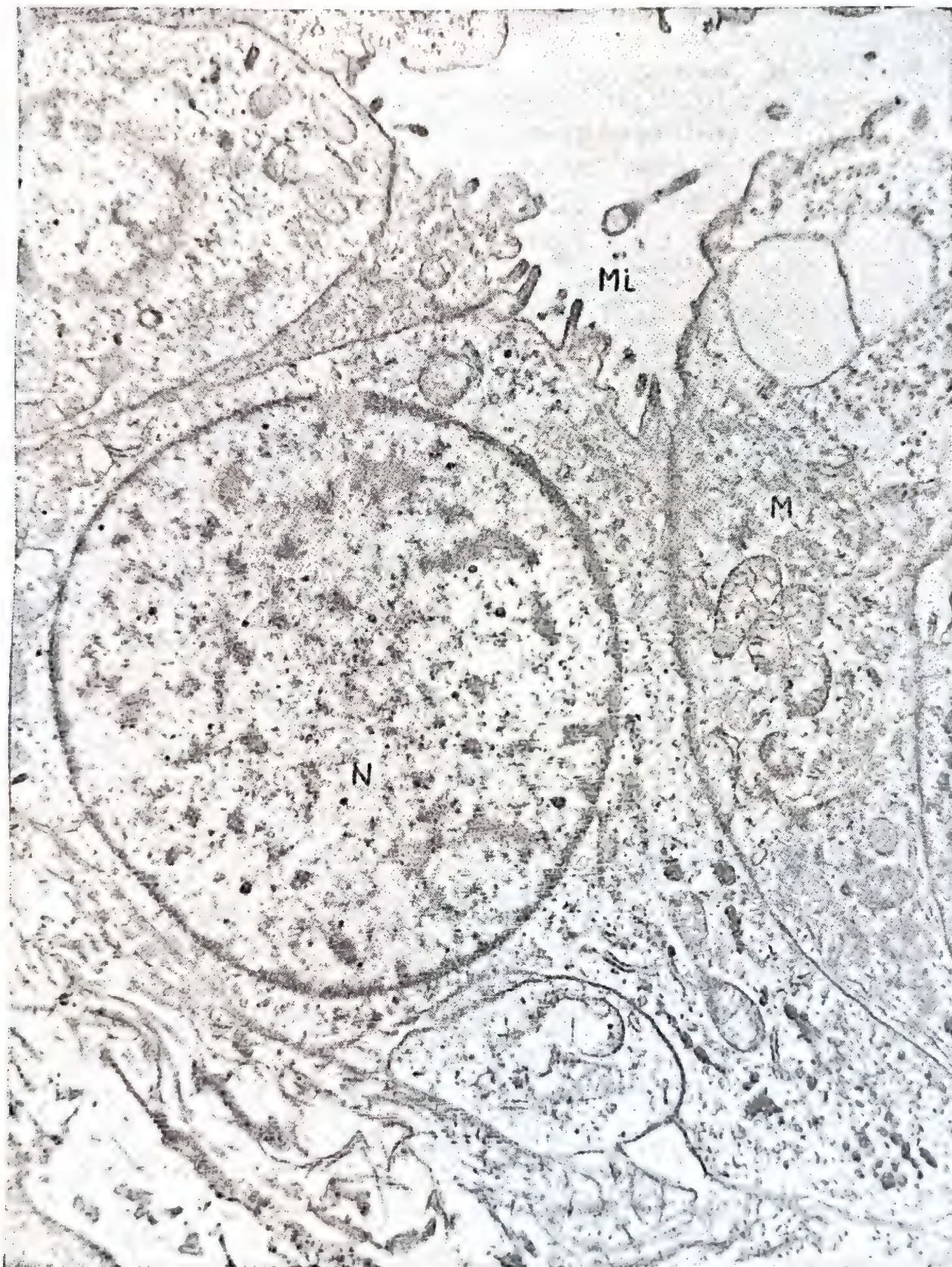
Existența acestei posibilități, a dus astăzi la utilizarea pe scară tot mai mare a analizei cristalografice cu raze X. Practic, ea permite vizualizarea tridimensională a macromoleculelor proteinelor și acizilor nucleici, făcând astfel posibilă analiza detaliată a tuturor elementelor spațiale existente la nivel subcelular.

Problema utilizării, la o scară mai largă rezidă în însăși complexitatea instalațiilor necesare. Fără aportul calculului matematico-electronic nu se poate pune problema obținerii unor rezultate rapide în interpretarea datelor, tocmai datorită complexității metodei de transformare a informațiilor într-o imagine tridimensională. În ciuda acestor dificultăți, difracția razelor X tinde să devină o tehnică tot mai utilizată datorită faptului că este singura cale cunoscută astăzi pentru a determina în totalitate aranjamentul atomilor în cele mai multe molecule.

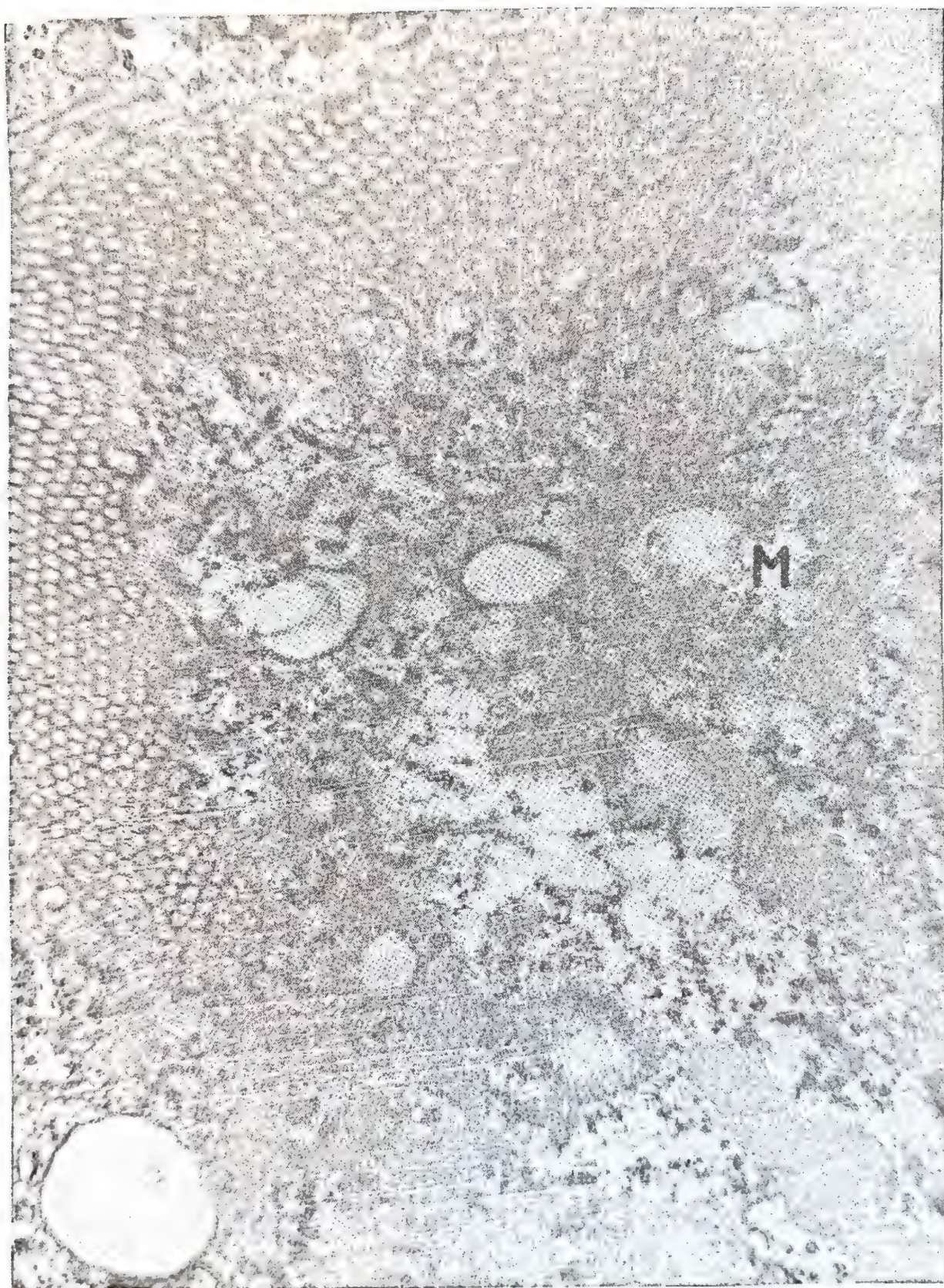
De exemplu, structura proteinei poate fi calculată la o rezoluție de 3-4Å dezvăluind principala serie a lanțului polipeptidic. Având un cristal de înaltă puritate s-a ajuns la revelarea cu o rezoluție 1,5Å punând în evidență poziția tuturor atomilor nehidrogeni din proteină.

Nu în ultimul rând ar trebui menționat aportul adus de cristalografia cu raze X în studiile de ADN, cum a fost în cazul modelului lui Crick și Watson în 1953, când cei doi au propus modelul, atât de cunoscut astăzi, al structurii ADN, pe baza interpretării datelor provenite în special din cristalografia cu raze X.

XVI. ELECTRONOMICROGRAFII



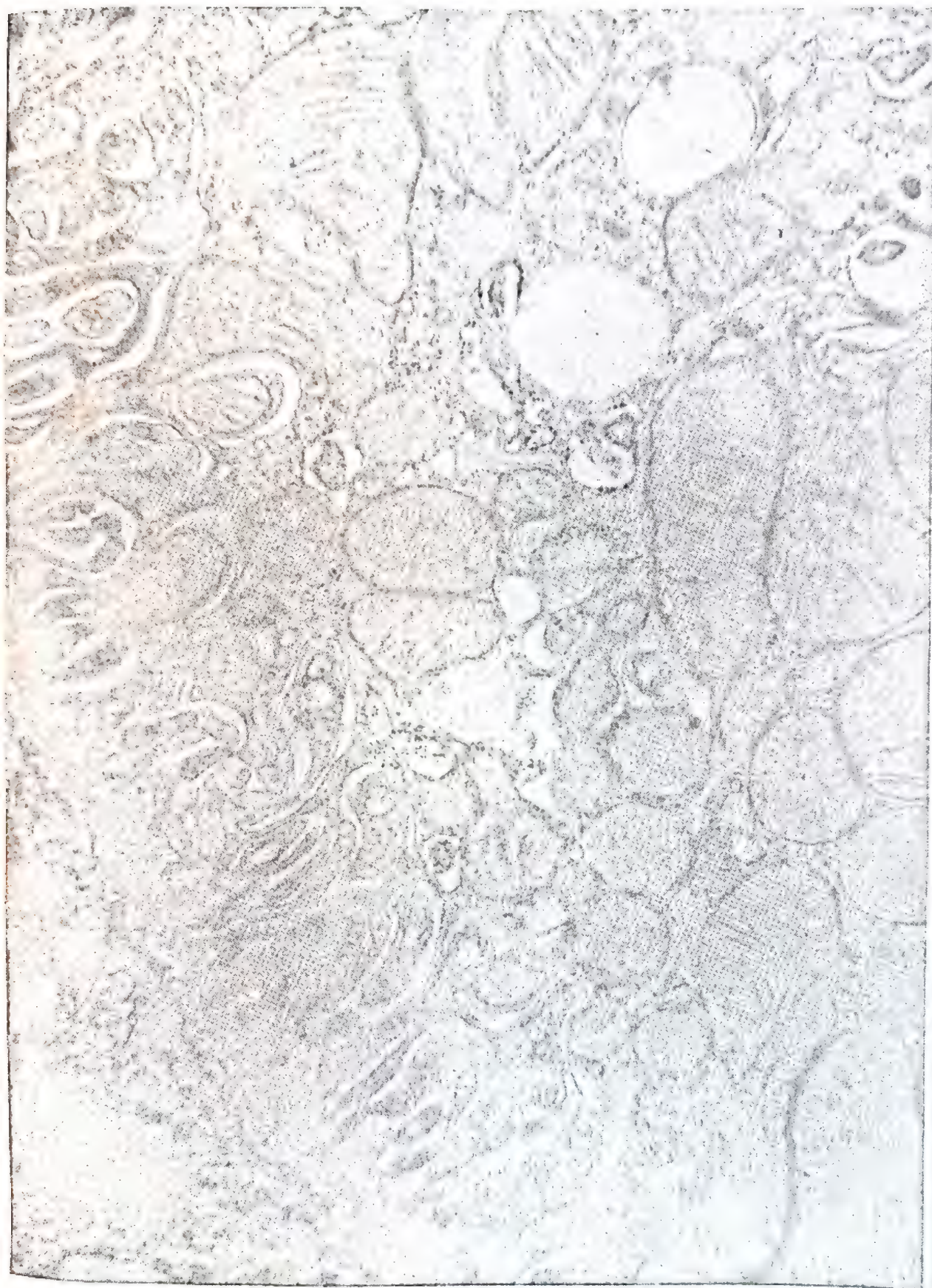
Planşa 1 Nefrocit embrionar uman - Microvili secţionaţi longitudinal (Mi), nucleu (N), mitocondrii (M) - 16.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



Planşa 2 Nefrocit tub contort proximal fetus uman - Microvili secţionaţi transversal (Mi), mitocondrii (M) ~51.200 X (colecţia Prof. Dr. C-tin Cotrutz)

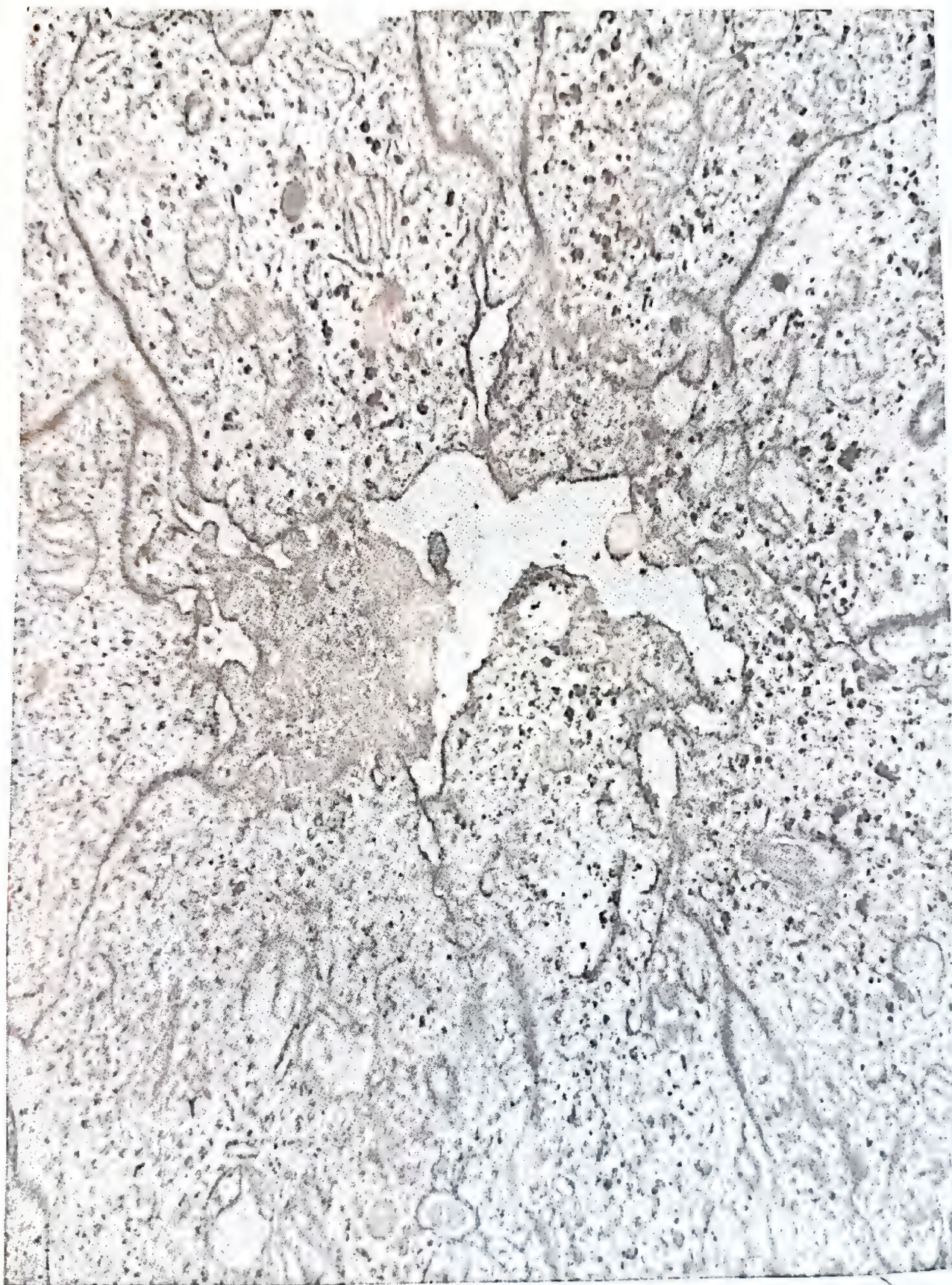


Planşa 3 Mucoasa nazală umană - Cili vibrațili secționați longitudinal - tijă cilului (T), corpusulul bazal (CB) - 58.000 X (colecția Prof.Dr.Cotrutz)

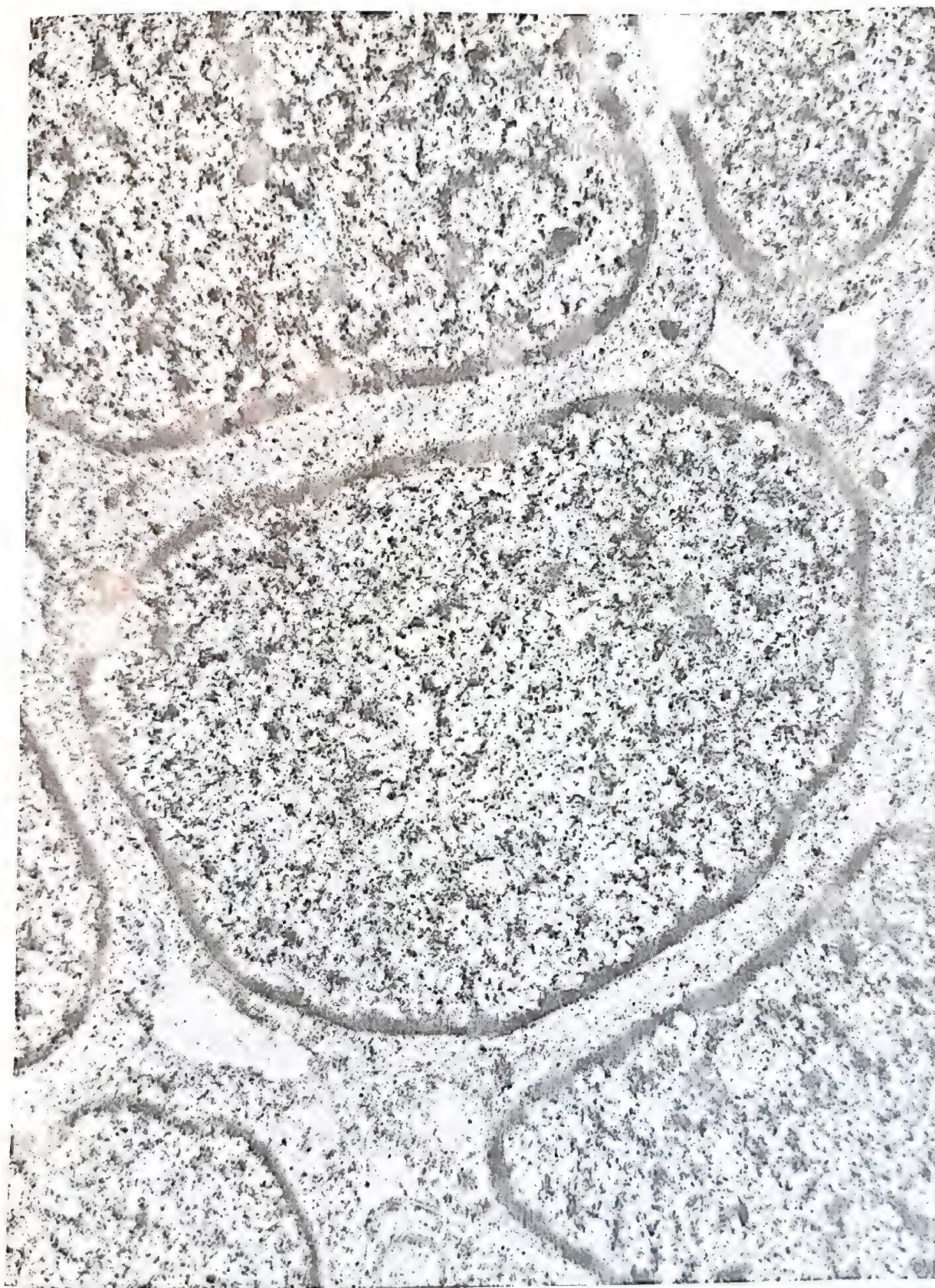


Plansa 4 Nefrocit tub contort distal fetus uman - Labirint bazal (LB), membrana bazală (MB) mitocondrii (M) - 48.000 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

15 C.Cotrutz



Planşa 5 Nefrocite embrion uman - Joncţiuni impermiabile (JI), mitocondrii (M), lizosomi secundari (LS) - 39.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



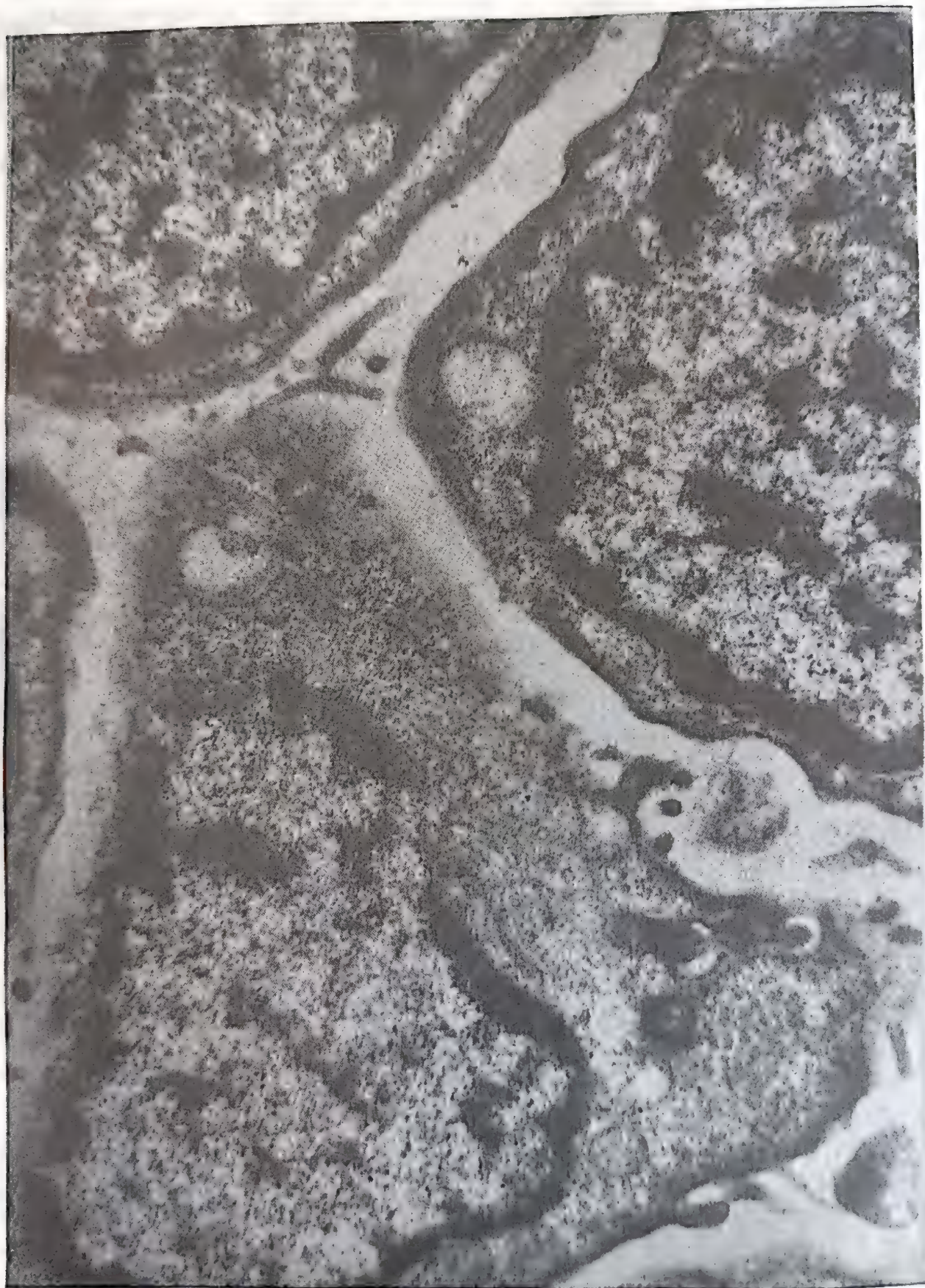
Plansa 6 Celule blastem metanefrogen uman - membrana cromatică (Mc), por nuclear (P), euromatina (E) - 26.000 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



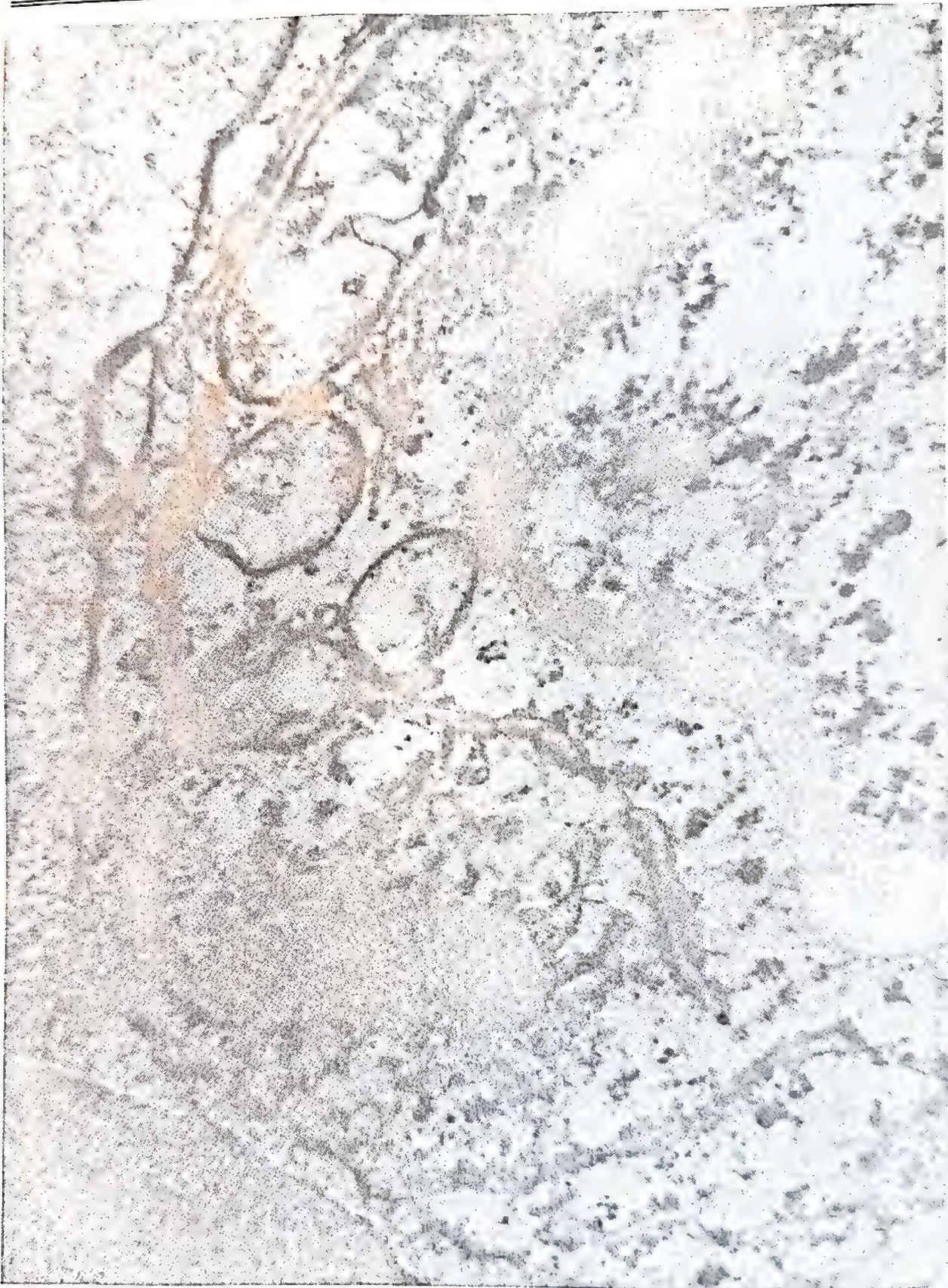
Planşa 7 Nefrocit fetal uman - Nucleu (N), nucleoli (Nu), mitocondrii (M), lizosomi (L) - 16.00 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



Planșa 8 Cancer colon - Nucleol atipic (ochelar) - 48.000 X
(colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



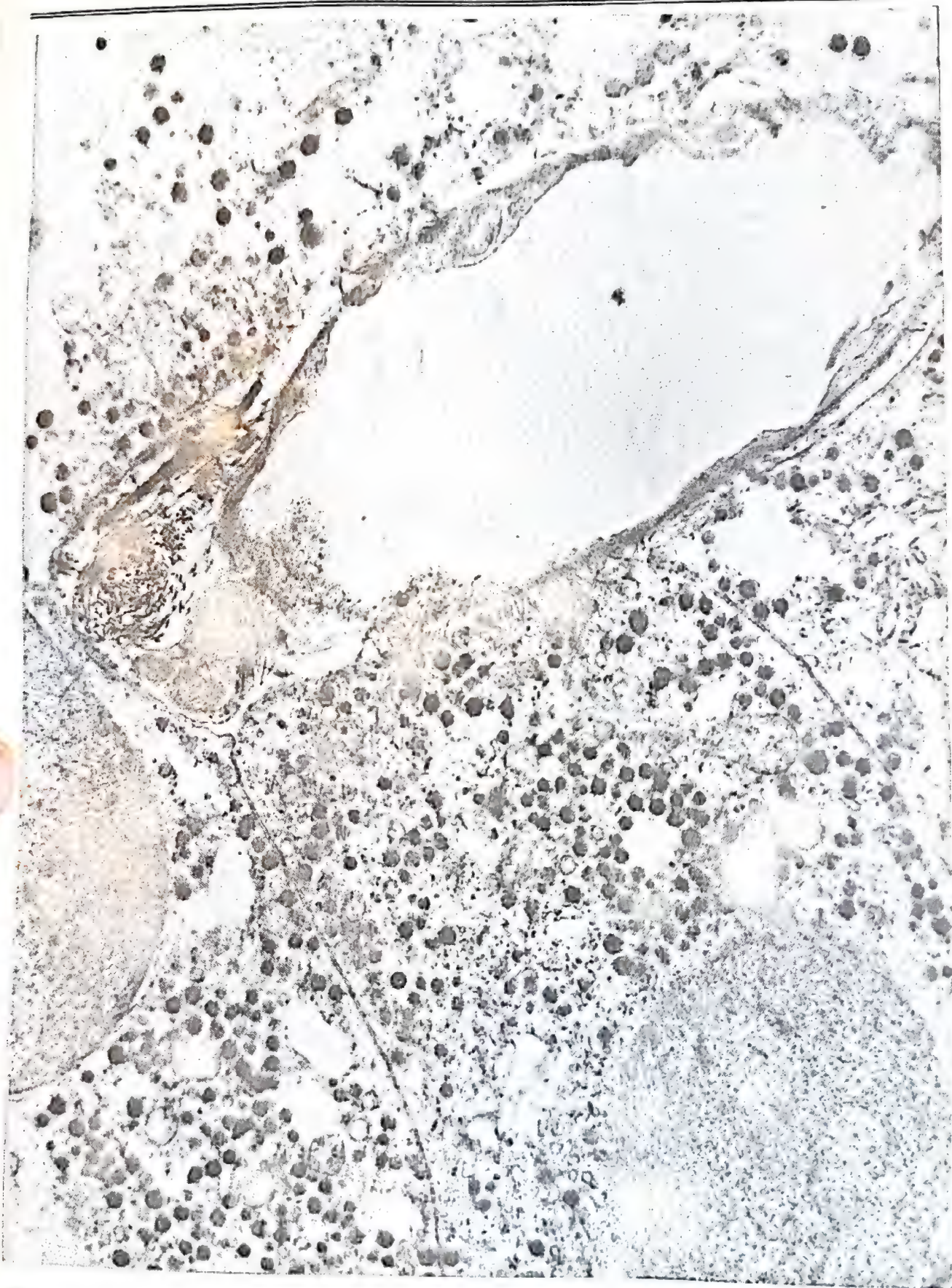
Planşa 9 Blastem metanefrogen uman - Nucleu (N), heterocromatina (H), pori nucleari (P), vezicula de endocitoza (Ve) - 16.200 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



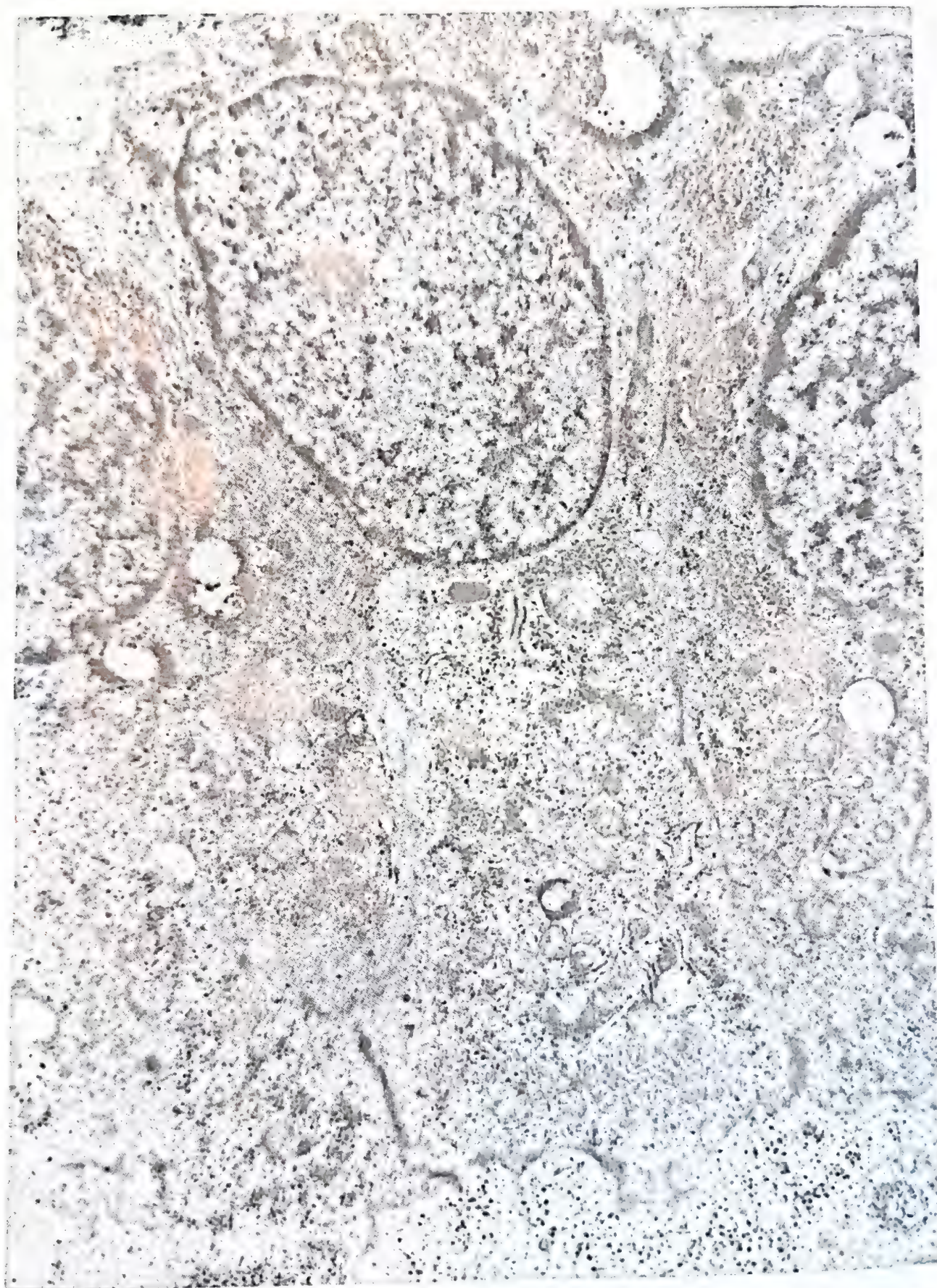
Planșa 10 Celula endotelială capilar corpuscul renal fetus uman - Reticul endoplasmatic granular (REG), ribosomi (R), mitocondrii (M), lumen capilar (Lc), hematie (H) - 45.000 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



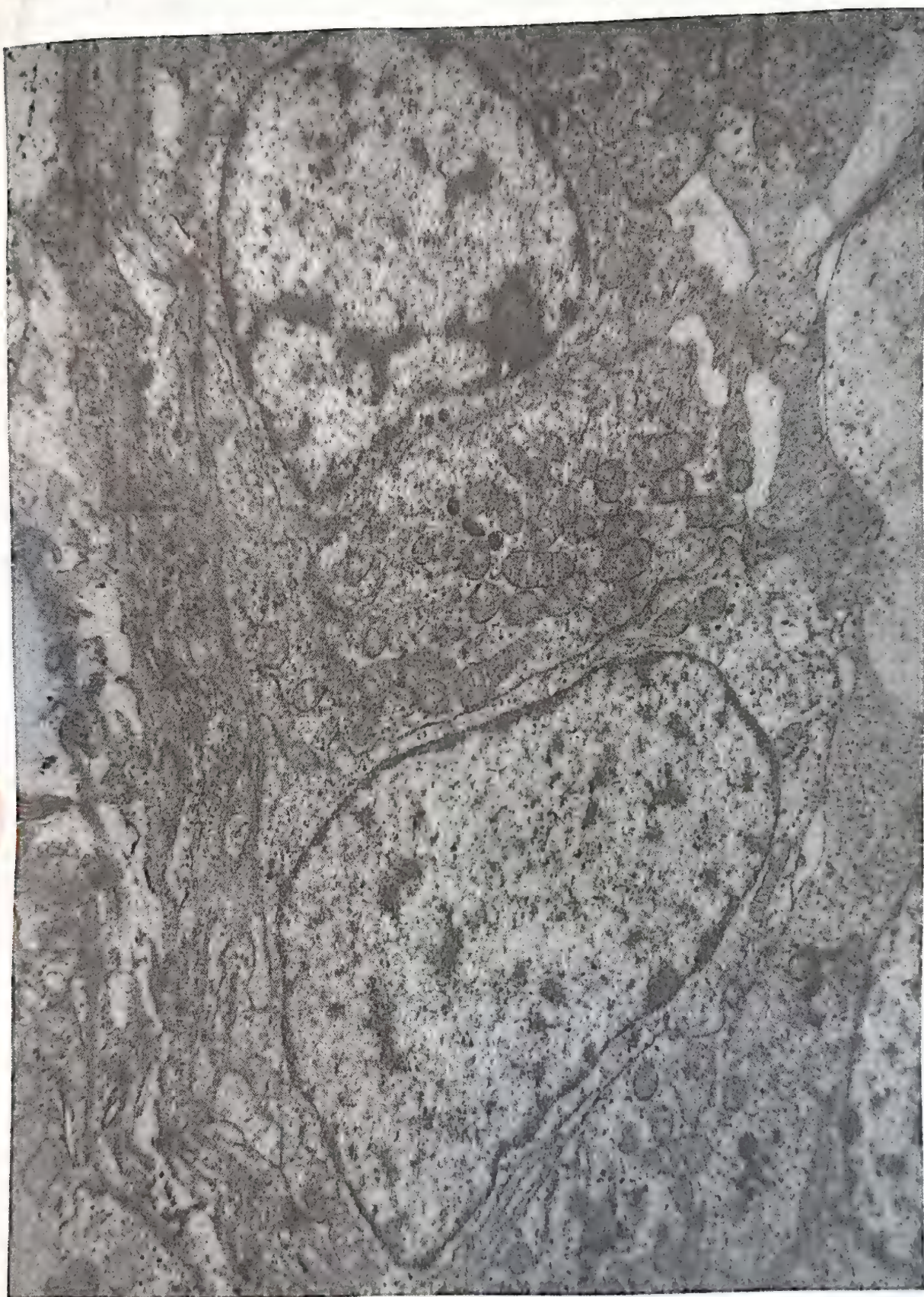
Planşa 11 Entrocit fetal uman - Complex Golgi (CG), faţa de formare (CIS), faţa de maturare (TRANS), nucleu (N), învelișul nuclear (IN), nucleonul (Nu), mitocondrie (M), lizosomi (L) - 41.300 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



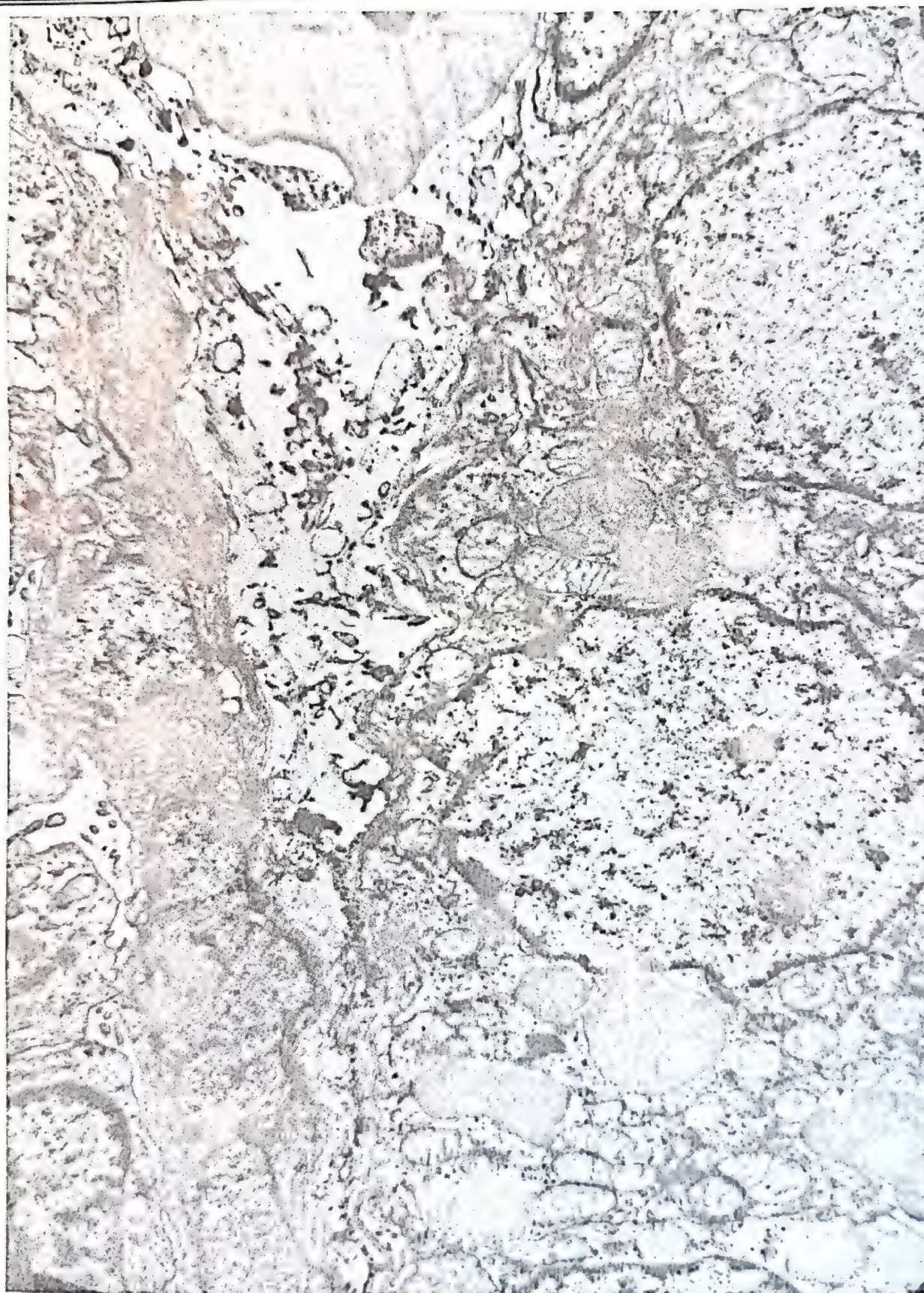
Planșa 12 Celula endocrină pancreas șobolan - Granule de secreție în diferite faze de maturare (G), capilar (C) - 16.000 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



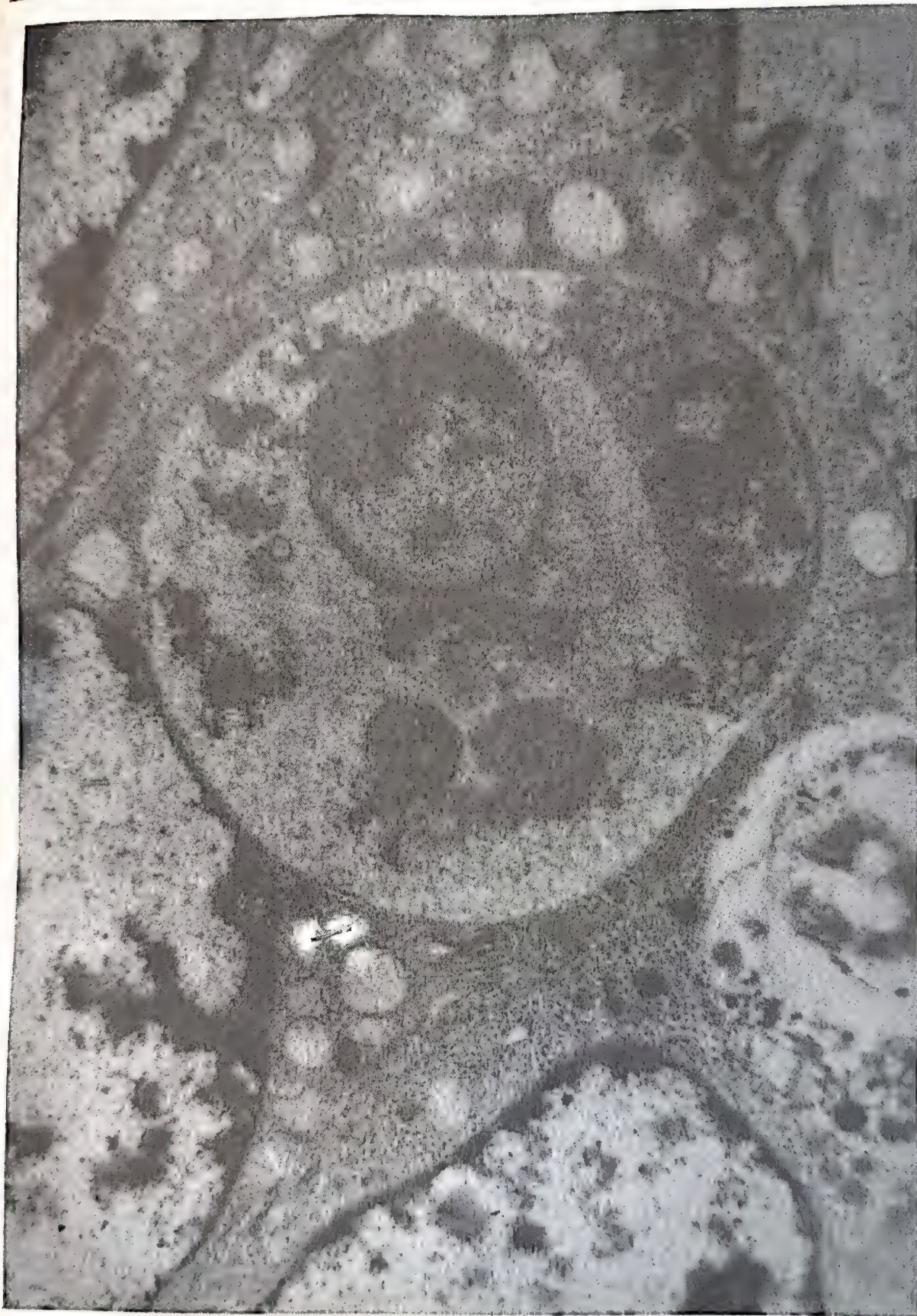
Planşa 13 Epiteliu mucoasa gastrică embrion uman - Granule de glicogen (GI)
6700 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



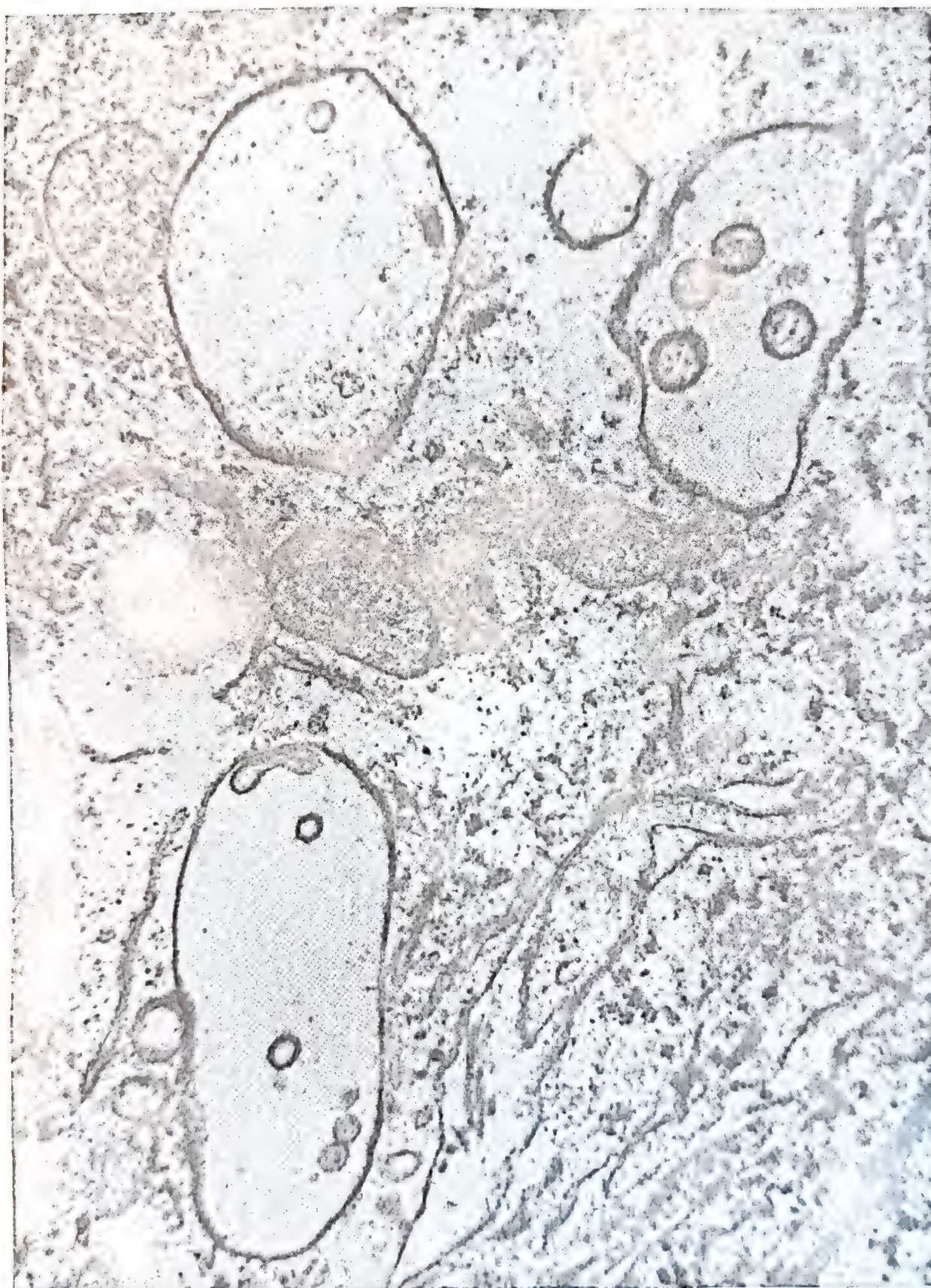
Planșa 14 Nefrocite embrion uman - Nucleu (N), mitocondrii (M), lizosomi secundari (Ls) - 4.400 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



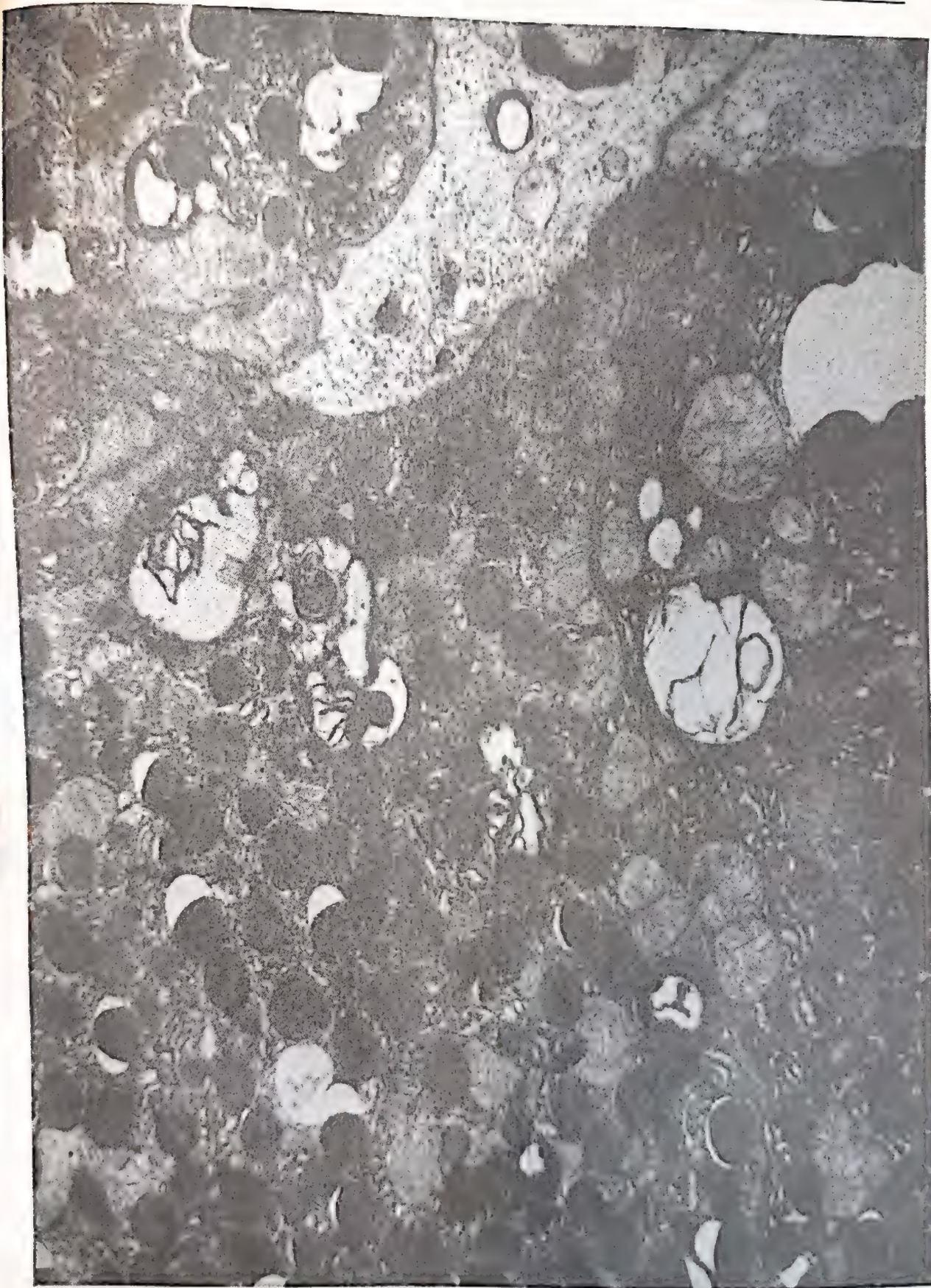
Planşa 15 Nefrocite embrion uman - Nucleu (N), nucleol (Nu), lizosom primar (Lz), lizosomi secundari (Ls), mitocondrii (M) - 17.600 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



Planşa 16 Cancer colon - Lizosom secundar atipic (Ls), nucleu (N) - 17.600 X
(colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



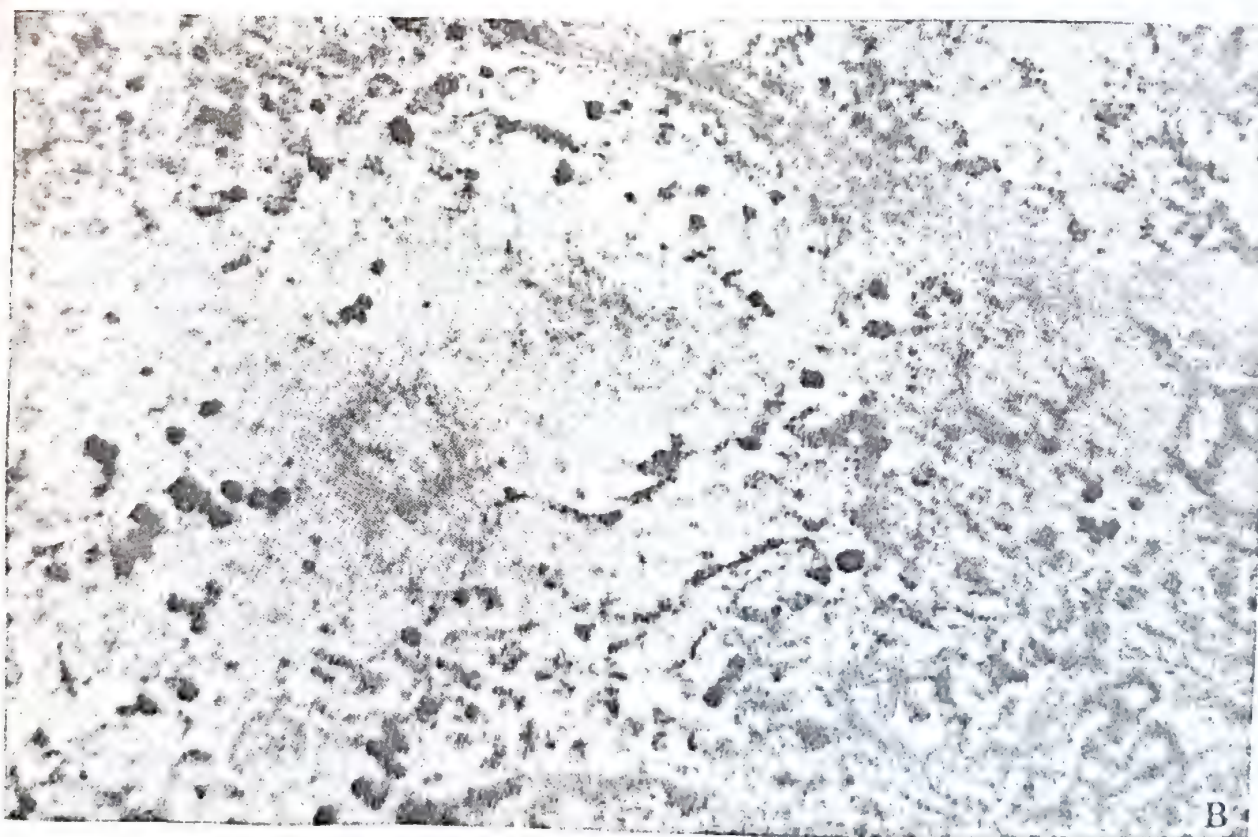
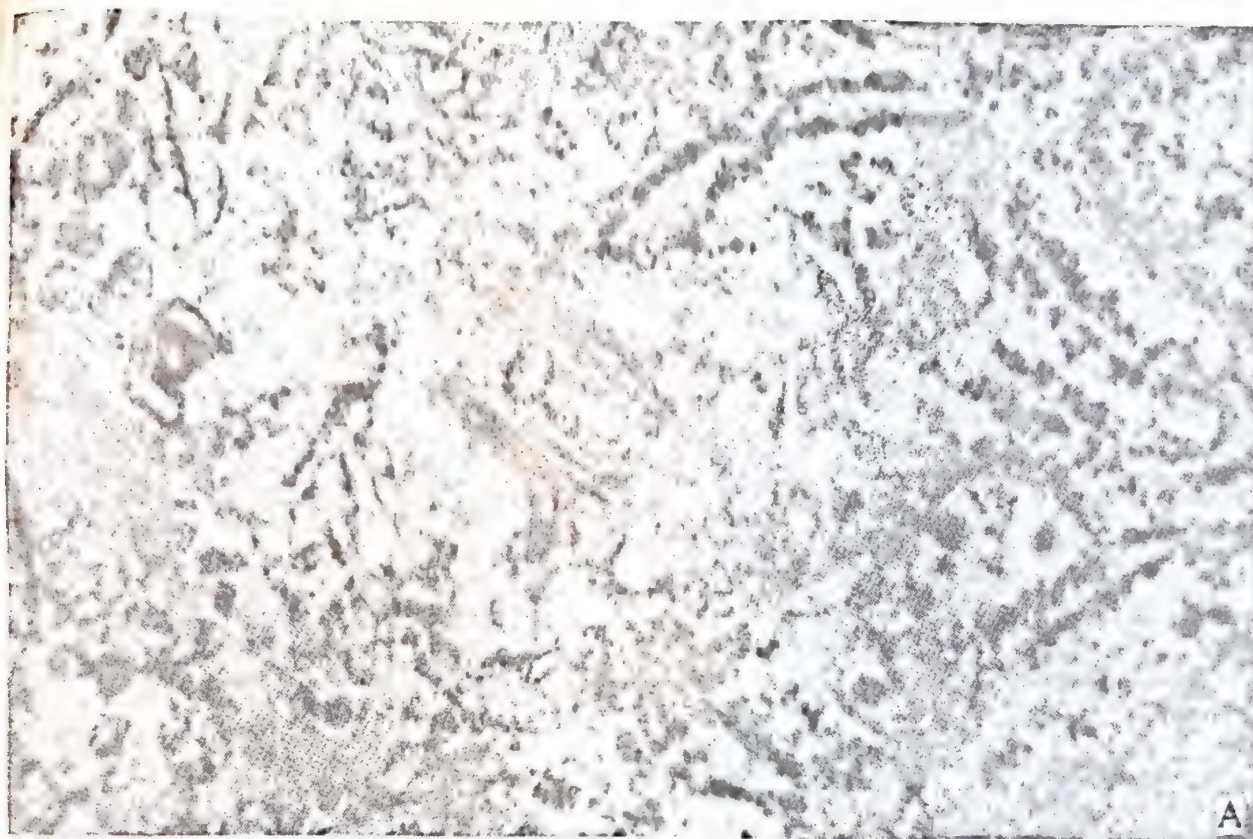
Planşa 17 Nefrocit embrionar uman - Corpi multiveziculari (Cmv), mitocondrie (M), reticul endoplasmatic granular (REG) - 59.600 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



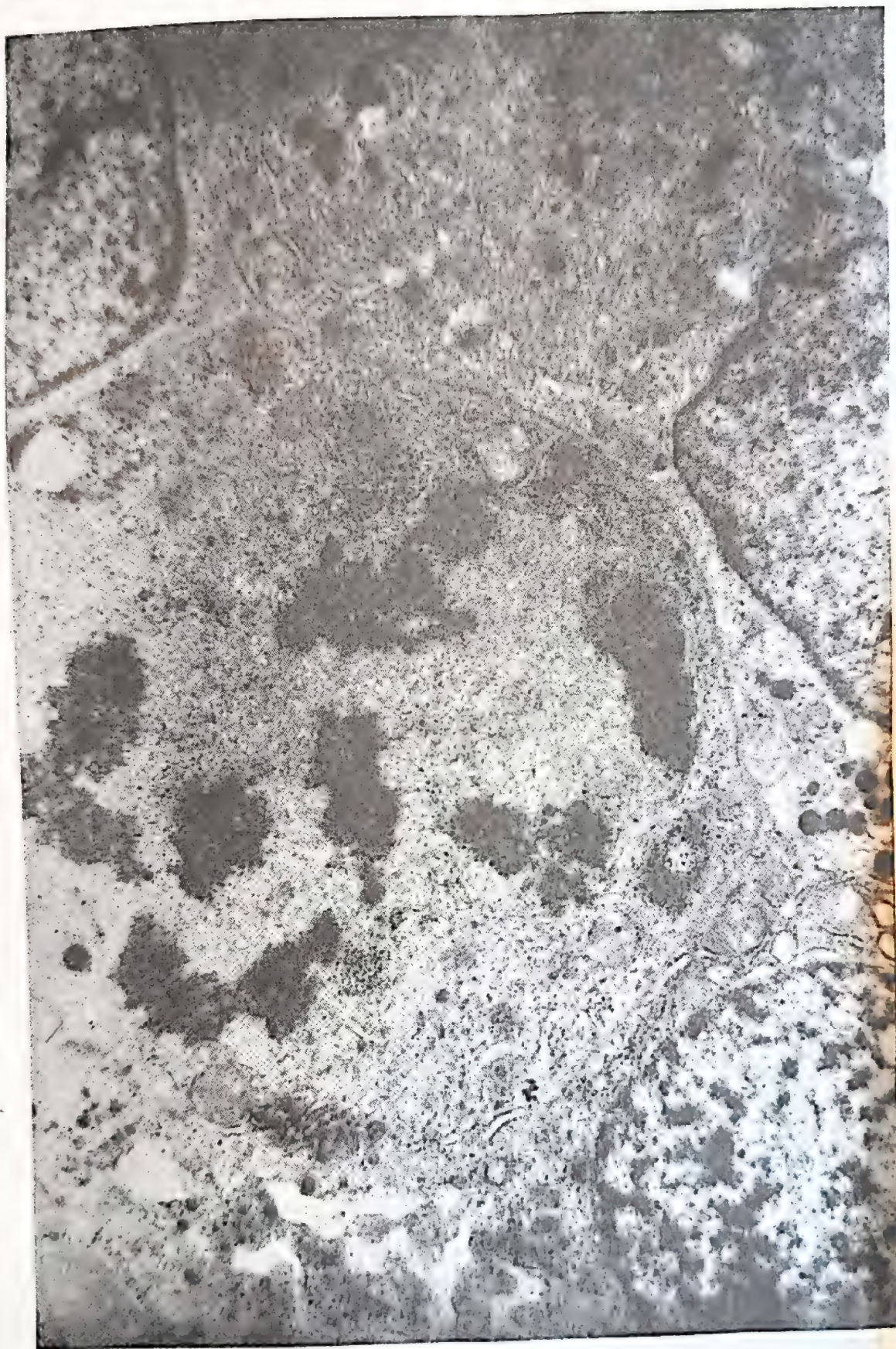
Planșa 18 Hepatocit șobolan - Figuri mielinice (Fm), mitocondrie (M), granule lipidice (Gl) - 17.600 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



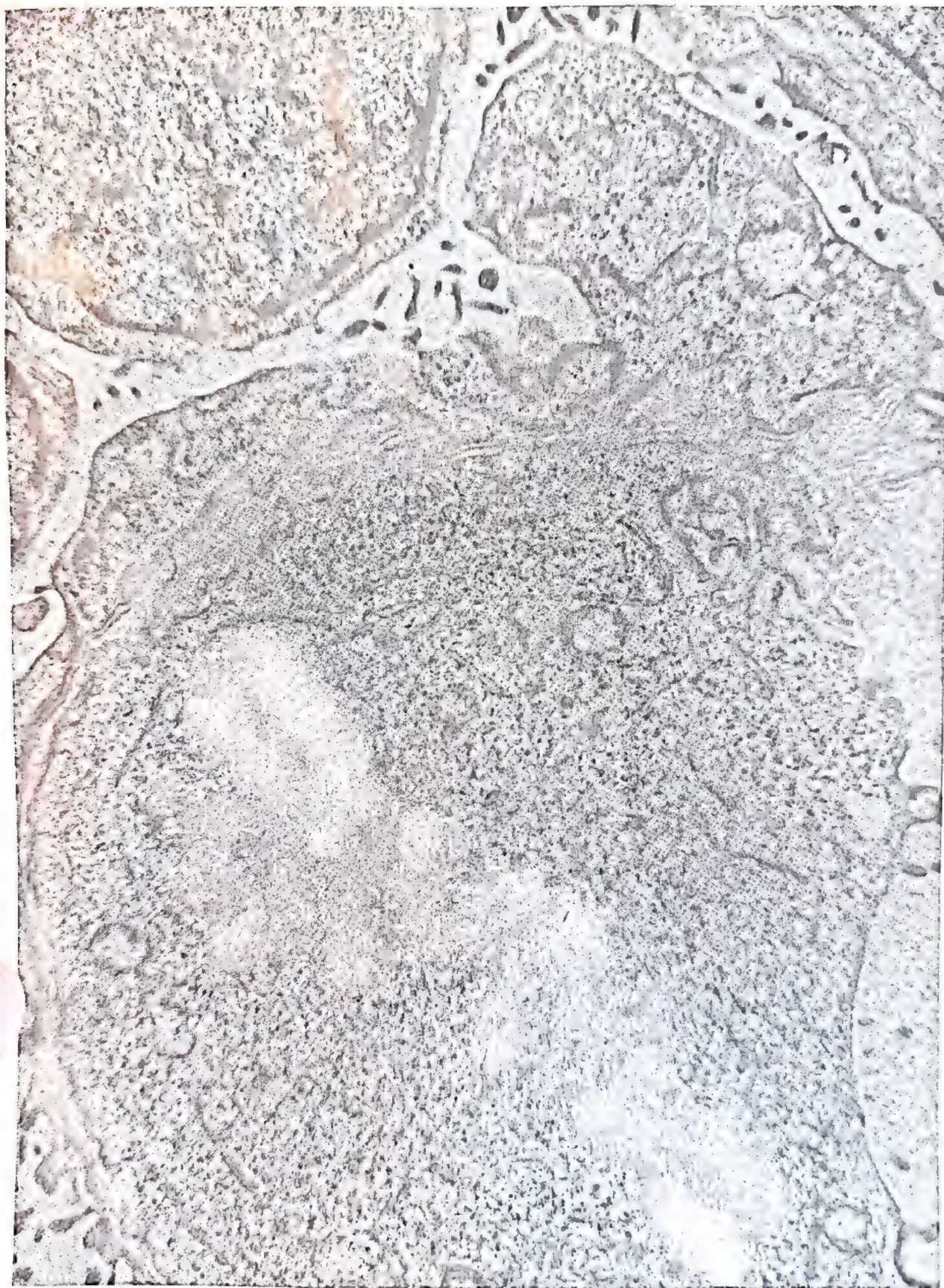
Planşa 19 Muşchi striat şobolan - Miofilamente (Mf) - 17.600 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



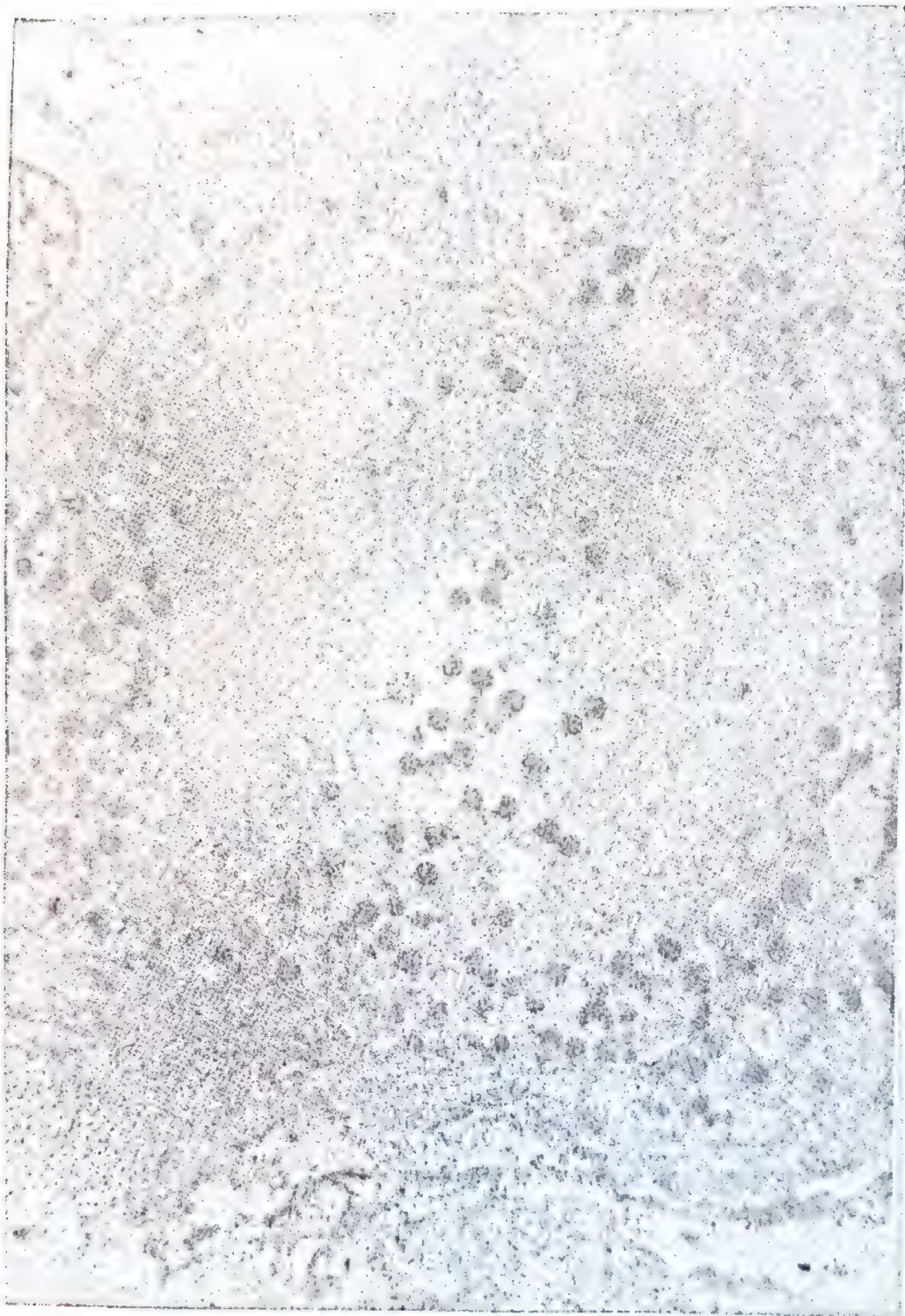
Planşa 20 Nefrocit embrionar uman - Centriol (C) - A.secţiune longitudinală; B. secţiune transversală - 84.000 X (colecţia Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



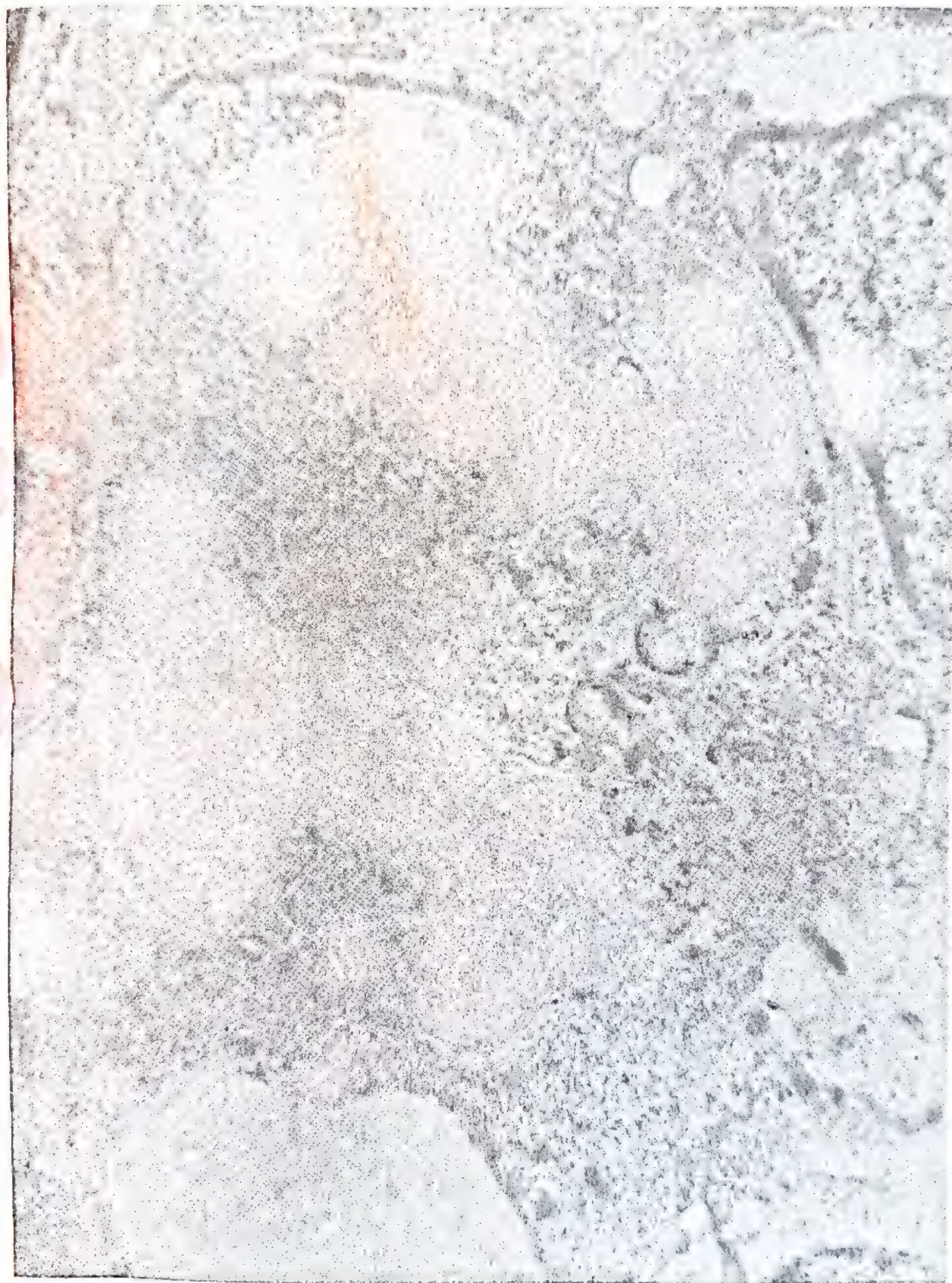
Planşa 21 Entrocyte fetus uman - Mitoza somatică - profaza, cromosom (Cr) - 20.000 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



Planșa 22 Endoteliu capilar metanefros uman - Mitoza somatică - metafaza -placa ecuatorială (Pe) - 26.000 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



Planşa 23 Celula SED din mucoasa gastrică embrion uman - Mitoza somatică - anafaza, cromosom (Cr) - 16.500 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



Planşa 24 Blastem metanefrogen uman - Mitoza somatică - telofaza - 18.700 X
(colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)



Planşa 25 Blastem metanefrogen uman - Mitoza somatică - telofaza, formarea învelișului nuclear (In) - 6.600 X (colecția Prof.Dr.C-tin Cotrutz)

XVII. BIBLIOGRAFIE

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. - *Molecular Biology of the cell*, Garland Publishing, Inc. (N.Y.), 1990.
2. Andreicut Silvia, Becus M., Lokotis M., Avrigeanu V. - *Biologie celulară*, Îndrumător de lucrări practice și demonstrații, Litografia I.M.F. Tg. Mureș, 1985.
3. Andrews A.T. - *Electrophoresis*, Oxford University Press (NY), 1981
4. Berkaloŭ A., Bourguet J., Favard P., Lacroix J.C. - *Biologie et Physiologie Cellulaires*, Vol.1, Herman, 1981.
5. Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K. - *Peptide mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecylsulfate and Analysis by gel Electrophoresis*, J. Biol. Chem, 52, 1102-1106, 1977.
6. Colowick S.P., Kaplan N.O. - *Methods in Enzymology*, Academic Press (NY), 1982.
7. Cooper T.G. - *The Tools of Biochemistry*, Wiley (NY), 1977.
8. Cotaescu I. - *Sângele normal și patologic*, Editura Facultății de Medicină, Timișoara, 1973.
9. Cotruț C. - *Biologie celulară*, Îndrumător de lucrări practice, Litografia I.M.F. Iași, 1989.
10. Darnell J., Lodish H., Baltimore D. - *Molecular Cell Biology*, Scientific American Book (NY), 1990
11. De Duve C. - *Exploring Cell with a Centrifuge*, Science, 189, 433-435, 1975.
12. De Duve C., Beaufay H. - *A Short History of Tissue Function*, J. Cell. Biol., 91, 293-299, 1981.
13. Defelipe J., Fairen A. - *Simple and reliable Method for Correlative Light and Electron Microscopic Studies*, J. Histochem. Cytochem, 41, 769-772, 1993.
14. DeRobertis E.D.P., DeRobertis E.M.F. - *Cell and Molecular Biology*, Saunders College, Philadelphia, 1980.
15. Dicușescu I., Onicescu Doina, Popescu L.M., Bostinaru P.A. - *Biologie Celulară*, Ghid pentru lucrări practice și demonstrații, Litografia I.M.F., București, 1980.
16. Gabe M. - *Tehniques Histologiques*, Masson et Cie., Paris, 1968.
17. Ganter P., Jolles G. - *Histochimie Normale et Pathologique*, Vol.1, II, Gauchier-Villars, 1970.

18. Griffin A.M., Griffin H.C. - *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, 1993.
19. Harold D.E., Walz W. - *Basis Techniques for cell Culturing*, The Humana Press Inc., 1992.
20. Kaplan J.C., Delpech M. - *Biologie Moléculaire et médecine*, Flammarion, Paris, 1990.
21. Kim F., Low N. - *A Gas Chromatograph Detector System for High-Confidence Identification*, *International Lab.*, 24, 17-20, 1994.
22. Mayer F. - *Moderne Elektronmikroskopie auf Zellulärem und Makromolekularem Niveau*, *Naturwissenschaften*, 74, 423-430, 1987.
23. Murray A.B., Schulze H., Blauw E. - *In Situ Embedding of Cell Monolayers Cultured on Plastic Surfaces for Electron Microscopy*, *Biotech. Histocem.*, 34, 269-272, 1991.
24. Pawley J.B. - *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Publ. Corp., 1990.
25. Ploaie P.G., Petre Z. - *Introducere în microscopia electronică*, Editura Academiei, București, 1979.
26. Robb I.A., Carpenter B.F. - *Rapid Ultrasonic Bath Processing for Electron Microscopy*, *Ultrastruct. Pathol.*, 15, 83-86, 1991.
27. Shaw P.J., Rawlins D.J. - *Three - Dimensional Fluorescent Microscopy*, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 56, 187-213, 1991.
28. Stelzer E.H.K. - *Confocal Fluorescent Microscopy in Cytology, Noninvasive Techniques in Cell Biology*, Wiley-Liss, Inc., 1990.
29. * * * *Centrifugation Techniques II-IV*, Opti Prep., Nicomed Pharma Oslo, Norway, 1993.

TABLA DE MATERII

INTRODUCERE	5
-------------------	---

I. MIJLOACE TEHNICE DE STUDIU ÎN BIOLOGIA CELULARĂ

1.1. Microscopul fonic	8
1.1.1. Microscopul fonic obișnuit	8
1.1.1.1. Partea mecanică	8
1.1.1.2. Partea optică	10
1.1.1.3. Sursa de fotoni	10
1.1.1.4. Tehnica de lucru	11
1.1.2. Microscopia prin fluorescență	13
1.1.2.1. Particularități în microscopie prin fluorescență	13
1.1.2.2. Tehnica de lucru	15
1.1.2.3. Aplicații practice	15
1.1.3. Microscopia în contrast de fază	17
1.1.3.1 Tehnica de lucru	19
1.1.3.2. Aplicații practice	20
1.1.4. Microscopia în lumină polarizată	20
1.1.4.1. Accesorii: polarizor, analizor	21
1.1.4.2. Tehnica de lucru	21
1.1.4.3. Aplicații practice	22
1.2. Microscopia electronică	22
1.2.1. Microscopul electronic de transmisie	24
1.2.1.1. Sistemul electronoptic	25
1.2.1.2. Sistemul electronic și consola de comandă	29
1.2.1.3. Sistemul de vid	30
1.2.2. Microscopul electronic cu voltaj înalt	30
1.2.3. Microscopul electronic analitic de transmisie	31
1.2.4. Microscopul electronic de baleiaj	31

✓ II. MIJLOACE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA FOTONICĂ

2.1. Metoda efectuării secțiunilor fine	35
2.1.1. Recoltarea	35
2.1.2. Fixarea	36
2.1.2.1. Fixarea prin agenți fizici	37
2.1.2.2. Fixarea prin agenți chimici	41
2.1.2.3. Practica fixării	44
2.1.3. Includerea în parafină	47
2.1.3.1. Deshidratarea	48
2.1.3.2. Clarificarea	48
2.1.3.3. Impregnarea cu parafină	49
2.1.3.4. Includerea propriu-zisă	49
2.1.4. Secționarea	52
2.1.5. Etalarea și lipirea secțiunilor pe lamă	54
2.2. Metoda secțiunilor la gheață și criotom	56
2.2.1. Tehnica secționării la microtomul de congelare	56
2.2.2. Tehnica secționării la criotom	58
2.2.3. Tehnica criodesicării	58
2.2.4. Metoda de congelare-substituție	59
2.2.5. Tehnica colorării secțiunilor la microtomul de congelare	59
2.3. Metoda etalării materialului biologic în monostrat	60
2.3.1. Tehnica frotiului de sânge	60
2.3.2. Colorarea frotiului de sânge	62
2.3.3. Componentele sângelui periferic evidențiate prin colorația May - Grünwald - Giemsa	66
2.3.3.1. Eritrocitul	66
2.3.3.2. Trombocitul	68
2.3.3.3. Leucocitele	70
2.3.4. Tehnica frotiului din materiale biologice provenite din organe ușor accesibile care prezintă o descuamare fiziologică	74
2.3.5. Tehnica frotiului din materiale biologice provenite din organe mai puțin accesibile	74
2.3.6. Tehnica amprentelor de organe	75
2.3.7. Tehnica colorării frotiurilor din sedimente oculare și amprente de organe	75

III. COLORAREA ȘI COLORANȚII ÎN BIOLOGIA CELULARĂ

3.1. Coloranții și mecanismele colorării	76
3.1.1. Coloranții. Generalități	76
3.1.2. Clasificarea coloranților	78
3.1.3. Mecanismele colorării	78
3.1.4. Principalele metode de colorare	79
3.1.4.1. Colorarea secțiunilor la parafină	80
3.1.4.2. Tehnica colorării cu HE	81
3.1.4.3. Colorații nucleare	83 out
3.1.4.4. Colorații citoplasmatiche	86 out
3.1.5. Colorații vitale	88
3.1.5.1. Considerații generale	88
3.1.5.2. Clasificarea coloranților vitali	90
3.1.5.3. Etapele colorației vitale	90
3.1.5.4. Particularitățile fizico-chimice ale soluțiilor coloranților vitali	91
3.1.5.5. Reguli generale de aplicare a coloranților vitali	91
3.1.5.6. Colorarea vitală a mitocondriilor	93 out

IV. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

4.1. Tipuri de informații care se pot obține prin microscopia electronică	94
4.2. Prelevarea probelor	94
4.3. Fixarea	95
4.4. Spălarea pieselor	97
4.5. Deshidratarea preparatelor	97
4.6. Includerea	97
4.7. Secționarea	101
4.7.1. Tipuri de ultramicrotoame	101
4.7.2. Cuțite pentru ultramicrotoame	102
4.7.3. Fasonarea blocurilor	103
4.7.4. Secționarea propriu-zisă și colectarea secțiunilor	104
4.8. Aplicarea secțiunilor ultrafine pe grilă	106
4.8.1. Grile suport	106
4.8.2. Pelicule suport	107
4.8.3. Contrastarea preparatelor biologice	108

4.8.3.1. Colorarea pozitivă	108
4.8.3.2. Contrastarea cu acetat de uranil	108
4.8.3.3. Contrastarea cu soluția Reynolds	109
4.8.3.4. Colorarea negativă	109
4.8.4. Metalizarea	110

↓ V. METODE CURENTE DE CITO ȘI ULTRACITOCHIMIE

5.1. Metode de citochimie	112
5.1.1. Recoltarea pieselor	112
5.1.2. Fixarea	112
5.1.3. Includerea	113
5.1.4. Secționarea	113
5.1.5. Evidențierea citochimică a unor substanțe minerale	114
5.1.5.1. Detectarea fierului ionic	114
5.1.5.2. Detectarea calciului ionic	115
5.1.6. Evidențierea citochimică a glucidelor	115
5.1.6. Evidențierea citochimică a lipidelor	116
5.1.7. Evidențierea citochimică a proteinelor	117
5.2. Evidențierea ultrastructurală a unor compuși chimici celulari	120

↓ VI. METODE CURENTE DE CITO ȘI ULTRACITOENZI-MOLOGIE

6.1. Date generale	121
6.2. Tehnica citoenzimologică	123
6.2.1. Recoltarea	123
6.2.2. Fixarea	123
6.2.3. Incubarea	124
6.2.4. Montarea	124
6.2.5. Vizualizarea	125
6.3. Detectarea citoenzimologică a oxidoreductozelor	126
6.4. Detectarea citoenzimologică a hidrolazelor	

VII. STUDIUL GENERAL AL CELULEI ȘI AL ÎNVELIȘULUI CELULAR

7.1. Date generale despre celulă	128
7.2. Aspectele celulei în funcție de tehnicile de studiu și observare	130
7.2.1. În microscopia fotonică	130
7.2.2. În microscopia electronică	130
7.3. Forma celulelor	131
7.4. Dimensiunile celulelor	133
7.5. Numărul celulelor	133
7.6. Învelișul celular	134
7.6.1. Plasmalema	134
7.6.1.1. Structura morfologică	135
7.6.1.2. Organizarea moleculară	135
7.6.1.3. Rolurile și proprietățile plasmalemei	135
7.6.2. Glicoalixul	135
7.6.3. Citoscheletul membranal	136
7.7. Specializările învelișului celular	137
7.7.1. Specializările plasmalemei polului apical	137
7.7.1.1. Microvilii	137
7.7.1.2. Cilii vibratili	138
7.7.2. Specializările plasmalemei polului bazal	140
7.7.3. Zonele de cuplaj celular	141
7.7.3.1. Joncțiuni de adezivitate	142
7.7.3.2. Joncțiuni impermeabile	144
7.7.3.3. Joncțiuni de comunicare	144
7.7.3.4. Interdigitațiile	145

VIII. STUDIUL NUCLEULUI ÎN INTERFAZĂ

8.1. Date generale	147
8.2. Forma și poziția nucleului	147
8.3. Dimensiunile nucleilor	148
8.4. Numărul nucleilor	148
8.5. Structura morfologică a nucleului	149
8.5.1. În microscopia fotonică cu contrast de fază	149
8.5.2. În microscopia electronică	150

8.5.2.1. Învelișul nuclear	150
8.5.2.2. Cromatina	151
8.5.2.3. Nucleolul	152
8.5.2.4. Spațiile intercromatiniene	152
8.6. Structura biochimică a nucleului	152

IX. ORGANITELE SINTEZEI ȘI SECREȚIEI CELULARE

9.1. Ribosomii	154
9.2. Reticulul endoplasmatic	155
9.2.1. Reticulul endoplasmatic granular	155
9.2.1.1. Microscopia fonică	155
9.2.1.2. În microscopia electronică	156
9.2.2. Reticulul endoplasmatic neted	158
9.2.3. Structura moleculară	159
9.3. Complexul Golgi	159
9.3.1. Structura în microscopia fonică	150
9.3.2. Structura în microscopia electronică	160
9.3.3. Structura moleculară	161

X. ORGANITE GENERATOARE DE ENERGIE. MITOCONDRIILE

10.1. Microscopia fonică a mitocondriilor	162
10.2. Ultrastructura mitocondriilor	163
10.3. Structura moleculară	164

XI. ORGANITELE DIGESTIEI CELULARE

11.1. Lizosomii	166
11.1.1. Structura electronomicroscopică	167
11.1.2. Structura moleculară	168
11.2. Peroxisomii	168
11.2.1. Ultrastructura peroxisomilor	169
11.2.2. Structura moleculară	169

XII. ORGANITELE MOBILITĂȚII CELULARE

12.1. Microfilamente	170
12.2. Microtubii	171
12.3. Centrul celular	172
12.3.1. În microscopia fotonică	172
12.3.2. În microscopia electronică	172
12.4. Incluziunile celulare	173
12.4.1. Substanțe proteice	174
12.4.2. Lipidele	175
12.4.3. Glicogenul	175
12.4.4. Substanțe minerale	175

XIII. DIVIZIUNEA CELULARĂ

13.1. Metode de studiu	176
13.1.1. Observarea în microscopia fotonică	176
13.1.2. Observarea în microscopia electronică	176
13.1.3. Utilizarea antimitoticilor	176
13.1.4. Izolarea aparatului mitotic	176
13.2. Mitoza	177
13.2.1. Mitoza somatică	177
13.2.1.1. Profaza	177
13.2.1.2. Metafaza	177
13.2.1.3. Anafaza	178
13.2.1.4. Telofaza	178
13.2.2. Mitoza reduțională	179
13.2.2.1. Profaza	179
13.2.2.2. Metafaza	180
13.2.2.3. Anafaza	180
13.2.2.4. Telofaza	181
13.2.3. Diviziunea de maturare	181
13.3. Amitoza	181

XIV. DIFERENȚIEREA CELULARĂ

14.1. Gameții	18
14.1.1. Spermatozoizii	18
14.1.2. Ovulul	18
14.2. Diferențierea în embriogeneză	18

XV. TEHNICI SPECIALE UTILIZATE ÎN BIOLOGIA CELULARĂ ȘI MOLECULARĂ

15.1. Culturi de celule	18
15.1.1. Tipuri de culturi de celule	18
15.1.2. Materiale de lucru	19
15.1.3. Tehnicile aseptice	19
15.1.4. Mediile de cultură celulară	19
15.1.5. Tehnica culturii celulare	19
15.1.6. Controlul culturii	19
15.2. Crio fractura	19
15.3. Fraționarea celulară	19
15.4. Cromatografia	20
15.4.1. Clasificare	20
15.4.2. Separarea proteinelor prin cromotografie	20
15.5. Electroforeza	20
15.6. Difracția cu raze X	21

XVI. ELECTRONOMICROGRAFII

XVII. BIBLIOGRAFIE

ERATA

pag. 7 - rând 9,11,14

" 10 - " 25

" 13 - " 8

" 15 - " 28,29

" 16 - " 18

" 35 - " 17,23

13,19,20

" 36 - " 1

4

" 37 - " 36

" 41 - " 25

" 45 - " 32

" 46 - " 4,9,13

" 48 - " 13

" 49 - " 16

" 50 - " 19

" 54 - " 2

32

" 57 - " 4

" 59 - " 18

" 66 - " 18

21

" 68 - " 35

" 70 - " 22

" 71 - " 6

" 74 - " 13

" 79 - " 11

" 85 - " 20,21

" " 32

" 94 - " 26

" 99 - " Fig.24

"100 - " 12

"132 - " 22

"134 - " 22

"136 - " 17,21,25

"150 - " 10

"155 - " 5

"158 - " 10

"165 - " 5

"170 - " 30

- biologice

- tapla

- biologice

- flubresecta

- imunofluoresecta

- biopsie

- biologice

- biologice

- oxitice

- biologice

- ovalalbuminei

- mercuriana

- bioeromat

- diaxonul

- Leuckhard

- parafina

- poi

- salicilat

- anhidra

- succindehidrogenaza

- celulata

- hemoglobulina

- trombosteiina

- promielocit

- Grünwald

- descumarea

- hematoxina

- este implicat

- fericiatura

- suprafetelor

- vial

- metilnadica

- musculare

- membrabei

- glicocalixul

- arasat

- trilamentate

- hepatocitate

- tripartite

- dendritice

biologice

talpa

biologice

fluorescenta

imunofluorescenta

biopsie

biologice

biologice

ascitice

biologice

ovalbuminei

mercurica

hieromat

dioxanul

Leuckardt

parafina

apoi

salicilat

anhidrida

succindehidrogenaza

celulara

hemoglobina

trombostenina

promielocit

Grünwald

descumamarea

hematoxilina

sunt implicati

fericiatura

suprafetelor

final

metilnadica

musculare

membranei

glicocalixul

atasat

trilamelate

hepatocite

tripartite

dendritice